

**AUFNAHME, DNA-SCHÄDIGENDE
EFFEKTE UND MUTAGENITÄT
DREI- UND SECHSWERTIGER
CHROMVERBINDUNGEN**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Universität Bremen

vorgelegt von
Annette Köster

Bremen 1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543119_0158

Annette Köster

Aufnahme, DNA-schädigende
Effekte und Mutagenität
drei- und sechswertiger
Chromverbindungen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Universität Bremen

Bremen 1988

Diese Arbeit hat dem Promotionsausschuß Dr. rer. nat. der
Universität Bremen vorgelegen. Das Promotionskolloquium
fand am 27.5.1988 statt.

1. Gutachter: Prof. Dr. D. Beyersmann
2. Gutachter: Prof. Dr. L. Rensing

Das Spezialistentum ist einer
der Tricks, um das Denken
zu verhindern.

Max Horkheimer

Summary

The sequence of the mutagen and carcinogen chromate uptake by a carrier, the intracellular reduction and the accumulation of reduced chromium species have been called the "uptake-reduction-model". In this study it should be investigated, whether chromate itself is the ultimate genotoxic agent or those compounds, which are produced by chromate reduction within the cells, especially chromium(III)-compounds.

Comparing the action of chromate with several chromium(III)-compounds in different test systems using isolated DNA, isolated nuclei and mammalian cells, the mechanism of chromium action should be clarified.

Neither hexavalent nor trivalent chromium induced single-strand breaks in isolated DNA. After incubation of nuclei isolated from calf thymus with Cr(III) and Cr(VI), trivalent but not hexavalent chromium was bound by the nuclei, and the induction of DNA lesions could be shown by alkaline elution of the DNA. Two chromium(III)-complexes were tested: $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Cr}(\text{gly})_3]^0$. Both produced single-strand breaks and DNA-protein cross-links. In another test system, a nick translation assay modified for the investigation of nicks in DNA of nuclei or cells, the induction of single-strand breaks in nuclei treated with Cr(III) could be confirmed. Also an instable complex of glutathione containing Cr(V) introduced nicks and was more active than Cr(III).

In uptake studies with V79-cells, a permanent hamster fibroblast line, could be clearly shown, that there does not exist an absolute impermeability of the plasma membrane for Cr(III)-compounds, as commonly assumed. All tested chromium-compounds, $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Cr}(\text{gly})_3]^0$ were taken up in a concentration and time dependent manner. The incubation with $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$ resulted in higher intracellular chromium concentrations than the incubation with the other two Cr(III)-complexes, but the highest concentrations were observed after incubation with chromate.

About 50% of total chromium per cell after incubation with $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ and about 20% after incubation with the other compounds were shown to be bound by the nuclei, indicating

an intracellular distribution of chromium(III) after its uptake by the cells.

Although chromium(III)-compounds were shown to be taken up by the cells, no DNA lesions could be detected with alkaline elution. Further investigation of their cytotoxic and mutagenic actions indicated the interference of chromium(III) with cell metabolism. Chromium-complexes with o-phenanthroline and bipyridine were cytotoxic and micromolar concentrations reduced the colony-forming ability of the cells, whereas $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Cr}(\text{gly})_3]^0$ showed no effect even up to concentrations of 2 mM.

$[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$ increased the mutation frequencies up to 23 times and 13 times higher than the spontaneously occurring frequencies, respectively. Even $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$, which gave contradictory results in different earlier mutation studies with bacteria and yeast, increased the mutation frequency in this study with V79-cells up to four times over normal. No mutagenic effect could be detected after incubation with $[\text{Cr}(\text{gly})_3]^0$.

In discussion of these results it is stressed that not only one single chromium-compound is responsible for the genotoxic action, but different mechanisms are possible at the same time. It is supposed that chromium(VI) does not react directly with DNA, but chromium(III) generated by intracellular reduction of chromate is capable to induce DNA-protein cross-links. Furthermore, neither Cr(III) nor Cr(VI) can produce single-strand breaks, but reactive intermediate compounds created during the reduction could be responsible. Part of the measured single-strand breaks can result from incision during chromium-induced DNA repair. Because of the mutagenic action of some chromium(III)-compounds without detectable DNA lesions in the alkaline elution, other interactions leading to mutation are reasonable, for example interaction with DNA synthesis.

In conclusion Cr(III) cannot be regarded as a harmless compound and the chromate reduction cannot be characterized as detoxification.

ABKÜRZUNGEN

bipy	Bipyridin
dATP	2'deoxy-Adenosin-5'Triphosphat
dCTP	2'deoxy-Cytidin-5'Triphosphat
dGTP	2'deoxy-Guanosin-5'Triphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl- Transferase
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
phen	o-Phenanthrolin
SCE	Schwester-Chromatid-Austausch
SSB	Einzelstrangbruch
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
TCA	Trichloressigsäure
TTP	Thymidin-5'Triphosphat
Thd	Thymidin
ZKP	Zellkernpuffer



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1	1
1.1	3
1.2	7
2	12
3	14
3.1	14
3.2	17
3.3	18
3.3.1	18
3.3.2	19
3.3.3	19
3.3.4	20
3.3.5	22
3.4	23
3.4.1	23
3.4.2	24
3.4.3	24
3.4.4	25
3.4.5	26
3.4.6	26
3.4.7	27
3.4.8	27
3.4.9	29
3.4.10	30
4	32
4.1	32

4.2	Chromwirkung auf isolierte Kalbsthymuszellkerne	33
4.2.1	Chrombindung an isolierte Zellkerne	33
4.2.2	Effekte auf das Chromatin der Zellkerne	35
4.2.2.1	Einfacher Filterbindungstest	35
4.2.2.2	Alkalische Elution	36
4.2.2.3	Nick Translations Test	39
4.3	Chromwirkung auf Säugetierzellen	41
4.3.1	Kultur von Hamsterzellen	41
4.3.2	Aufnahme von Chromverbindungen in Hamsterzellen	43
4.3.2.1	Permeabilisierte Zellen	43
4.3.2.2	Chromaufnahme in Hamsterzellen und Effekt der Nachinkubation	45
4.3.2.3	Chromaufnahme in die Zellen und Bindung an den Zellkern	47
4.3.3	Cytotoxizität der Chromverbindungen	51
4.3.4	Alkalische Elution der Hamsterzellen	53
4.3.4.1	Einführung von Einzelstrangbrüchen mit Röntgenstrahlung	53
4.3.4.2	Einfluß des pH-Wertes der Elutionslösung	56
4.3.4.3	Alkalische Elution der V79-Zellen nach Inkubation mit Chromverbindungen	57
4.3.5	Mutagenität von Chromverbindungen	59
5	Diskussion	63
5.1	Chrom-Aufnahme	61
5.2	Genotoxische Wirkungen von Chromverbindungen	67
5.2.1	Isolierte DNA	67
5.2.2	Isolierte Zellkerne	69
5.2.3	Zellen in Kultur	70
5.3	Mögliche Mechanismen der Chrom-Genotoxizität	75
6	Zusammenfassung	77
7	Literaturverzeichnis	80

1 Einleitung

In den Industrienationen ist Krebs mittlerweile die zweithäufigste Todesursache. Aufgrund epidemiologischer Untersuchungen schätzt die Weltgesundheitsorganisation den Anteil umweltbedingter Krebserkrankungen auf 70% (Lehmann, 1982; Buchmann et al., 1987; Montesano, 1987). Neben biologischen und physikalischen Faktoren spielt dabei der Einfluß chemischer Verbindungen die wahrscheinlich größte Rolle.

Zu den chemischen Noxen gehören auch eine Vielzahl von Metallverbindungen, die in der Umwelt und Arbeitswelt nach wie vor starke Verwendung finden. Einigen Metallverbindungen wurden mutagene und/oder krebserzeugende Eigenschaften nachgewiesen. Dazu gehören die von der "Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe" der Deutschen Forschungsgemeinschaft als "eindeutig krebserzeugend" eingestuften Verbindungen von Chrom, Nickel, Arsen, Beryllium, Cobalt, Antimon und Cadmium (Deutsche Forschungsgemeinschaft, 1987); bei Verbindungen von Blei und Eisen liegen bisher nur widersprüchliche Ergebnisse aus Kurzzeittests und Tierversuchen vor.

Obwohl die Forschung auf dem Gebiet der Metalltoxikologie in den letzten Jahren stark zugenommen hat, ist über die Wirkungsmechanismen krebserzeugender Metallverbindungen erst relativ wenig bekannt. Man möchte beispielsweise gern wissen, ob sie direkt mit dem Träger der genetischen Information, der DNA, reagieren oder über indirekte Mechanismen, z.B. Beeinflussung der DNA-Reparatur, zu Mutationen führen. Von besonderer Bedeutung für die Wirkung ist die Bioverfügbarkeit der Verbindungen, d.h. ihre Fähigkeit mit biologischem Material in Wechselwirkung zu treten. Damit eine Metallverbindung Mutationen auslösen kann, muß sie z.B. überhaupt in das Zellinnere gelangen können. Die Aufnahme und Verteilung im Organismus und in Zellen, sowie die Wechselwirkung mit Zellbestandteilen, wird von den chemischen und physikalischen Eigenschaften wie Ladung,

Oxidationsstufe, Löslichkeit, Molekül- bzw. Partikelgröße und -form und Liganden bestimmt. Damit ist zu erklären, daß nicht alle Verbindungen eines Metalls das gleiche toxische Potential besitzen, einige sogar essentielle und toxische Eigenschaften zugleich haben.

Gerade das Chrom, das inzwischen zu den bestuntersuchten Metallen gehört, ist dafür ein gutes Beispiel. So werden die mutagenen und carcinogenen Effekte von den meisten Autoren nur den sechswertigen Verbindungen zugeschrieben. Verbindungen des dreiwertigen Chroms, die Hauptbestandteil in industriellen Emissionen sind (Langerwerf, 1985), gelten dagegen als nicht toxisch, da sie Zellmembranen nicht durchqueren können.

Aus mehreren Gründen ist aber gerade die Untersuchung der dreiwertigen Chromverbindungen von besonderer Bedeutung: Aus der Feststellung, daß das sechswertige Chrom bald nach seiner Aufnahme in Zellen als dreiwertiges vorliegt, ergibt sich die Frage, welche Form für die genotoxischen Wirkungen verantwortlich ist. Unklar ist auch, ob es spezifische Bedingungen gibt, unter denen dreiwertiges Chrom die Zellmembran passieren kann. Die Ansicht, dreiwertiges Chrom sei unschädlich, ist so stark verbreitet, daß von einigen Arbeitsmedizinern nur sechswertiges Chrom als relevant angesehen wird (Lewalter et al., 1985). Die gleichen Autoren sprechen bei einer Reduktion des sechswertigen Chroms im Organismus - gemeint ist der Mensch - von Detoxifikation. Steinhoff et al. (1986) möchten deshalb die Einführung eines Schwellenwertes für das krebserregende Chromat wieder neu diskutieren. Strittig ist auch die Frage, ob industrielle Chromemissionen nur dann schädlich sind, wenn sie sechswertiges Chrom enthalten.

Ob die Belastung mit dreiwertigen Chromverbindungen nicht auch gesundheitliche Schäden bewirken kann, ist durch epidemiologische Untersuchungen allein nicht zu klären, da die Beschäftigten der chromerzeugenden und -verarbeitenden Industrien Stoffgemischen ausgesetzt sind, die meist neben drei- und sechswertigen Chromverbindungen auch noch andere Metalle und Stoffe enthalten.

Untersuchungen mit Versuchstieren und in vitro Experimente können hier zur Klärung beitragen. Darüberhinaus bieten sie die Möglichkeit, die Mechanismen der Chromogenotoxizität und den Zusammenhang zur Krebsentstehung besser verstehen zu lernen.

1.1 Genotoxische Veränderungen

Das Interesse an der Untersuchung genetischer Veränderungen ist in den vergangenen Jahren stark gestiegen, weil Störungen der Genexpression und der Genomstruktur als wichtige Schritte in der Entwicklung von Krebszellen angesehen werden. Es ist daher eine ganze Palette von Kurzzeittests entwickelt worden, die es ermöglichen, Schäden an der DNA und auch auf höheren Organisationsebenen, den Chromosomen, festzustellen.

An der DNA ist eine Vielzahl von Schäden möglich, die in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt sind (Abb.1).

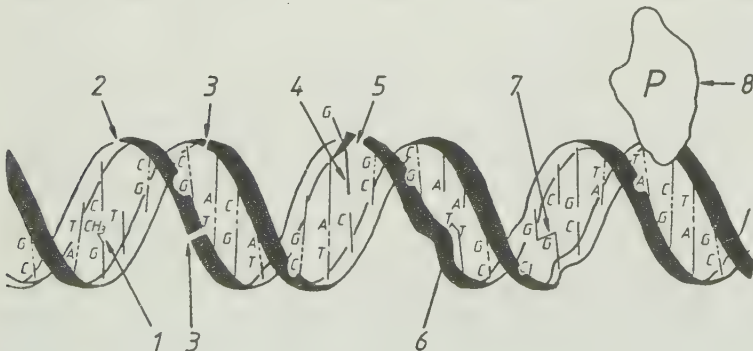


Abb. 1: Schematische Darstellung von DNA-Veränderungen

Neben den Veränderungen einzelner oder benachbarter Basen, z.B. Methylierung einer Base (1) oder durch UV-Strahlen

induzierte Dimerisierung zweier Basen (6) gibt es auch den Verlust einer Base (2), die sogenannte AP-Stelle (Apurin- oder Apyrimidin-Stelle). Substanzanlagerungen an das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA (4) kann eine Destabilisierung bewirken, die zum Einzelstrangbruch (5) führen kann. Aber auch der Angriff chemischer Radikale, gebildet z.B. durch ionisierende Strahlung oder bei der Reduktion des molekularen Sauerstoffs, produziert Einzelstrangbrüche (SSB) und Doppelstrangbrüche (DSB) (3). Drei Arten der Vernetzungen sind bekannt. Ein DNA-Strang kann intramolekular vernetzt werden oder mit dem gegenüberliegenden Strang, wie in (7) als kovalente Bindung zwischen zwei gegenüberliegenden Basen dargestellt ist. An einer solchen Interstrang-Vernetzung kann eine Chemikalie auch direkt beteiligt sein. Daneben gibt es noch die Vernetzung eines DNA-Stranges mit einem Proteinmolekül (8).

Die biologische Bedeutung dieser Schäden variiert stark. Einerseits hängt sie davon ab, welches Gen davon betroffen ist und andererseits ob und wie schnell der Schaden beseitigt werden kann. Dafür stehen der Zelle eine Reihe von Reparaturprozessen zur Verfügung. Eine fehlerhafte Reparatur sichert der Zelle zwar das Überleben (Toleranzmechanismus), führt aber zu Fehlern in der Nucleotidsequenz und somit zu Mutationen.

Auf der Ebene der Chromosomen sind vor allem mit Hilfe von speziellen Färbetechniken Chromosomenaberrationen, auch Chromosomenmutationen genannt, festgestellt worden. Bemerkenswert ist die Beobachtung, daß in Krebszellen ein oder mehrere Typen dieser Aberrationen bei bestimmten Chromosomen gefunden wurden, wobei es spezifische Veränderungen je nach Krebsart zu geben scheint (Bartnitzke, 1983).

Die häufigste Aberration ist die Translokation, bei der ein Abschnitt eines Chromosoms auf ein anderes, nicht homologes übertragen wird. Bei der reziproken Translokation werden zwei Abschnitte zweier Chromosomen gegeneinander ausgetauscht ((1) in Abbildung 2). Die Dissoziation (2) ist eine Genommutation. Zu Veränderungen der Chromatinmenge führen Endstückverlust (3), Deletion

(4) und Duplikation (5); eine Umordnung innerhalb eines Chromosoms wird Inversion (6 und 7) genannt.

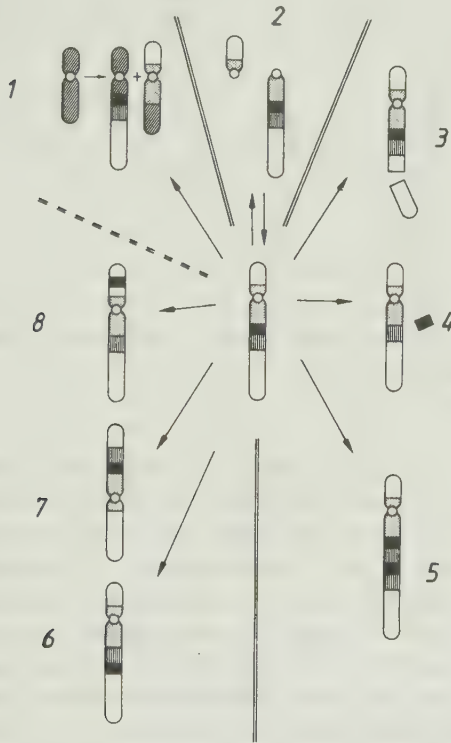


Abb.2: Schematische Darstellung von Chromosomen-Aberrationen (aus: Kleinig, H. und Sitte, P., 1986, S.178)

Obgleich die Mechanismen, die zur Entstehung dieser Chromosomen-Veränderungen führen, noch weitgehend ungeklärt sind, gibt es plausible Modelle über deren Zusammenhang zur Krebsentstehung (z.B. die Oncogentheorie, vergl. Waring und Ponder, 1987). Im Gegensatz zu den oben genannten Aberrationen sind bei den Schwesterchromatidaustauschen (SCE) homologe Abschnitte innerhalb eines Chromosoms betroffen und keine genetischen Änderungen meßbar. Dennoch wird die Erhöhung der SCE's durch mutagene und carcinogene

Stoffe als empfindliches Zeichen für die Wechselwirkung dieser Stoffe mit den Chromosomen gewertet. Der Mechanismus der SCE's ist ebenfalls nicht bekannt, ist aber als Rekombinationsvorgang in geringem Ausmaß ständig meßbar.

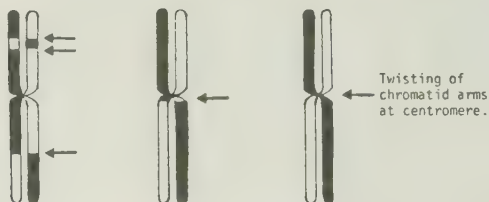


Abb. 3: Schwesterchromatidaustausche 1) Drei Austausche, 2) SCE in der Nähe des Centromers, 3) Vertauschung der Chromatide am Centromer, kein SCE. (aus: Venitt, S. und Parry, J.M., 1984, S.231)

Neben der direkten Schädigung der DNA sind auch indirekte Mechanismen bekannt. Dazu zählt man z.B. die Herabsetzung der Genauigkeit der DNA-Synthese. Einige krebserregende Metallverbindungen, mit denen in Kurzzeittests keine positiven Ergebnisse erzielt wurden, zeigten hier eine Wirkung (Sirover und Loeb, 1976). Eine Verstärkung der Mutagenität von UV-Strahlen durch verschiedene Metallverbindungen läßt sich durch eine Störung der Reparaturprozesse erklären (Hartwig, 1987) und müßte nach dieser Einteilung ebenfalls zu indirekten Mechanismen gezählt werden.

Aufgrund der Vielfalt der möglichen Schäden auf den verschiedenen Ebenen, muß jeder Stoff in den unterschiedlichen Testsystemen auf seine Wirkung untersucht werden. Im folgenden Abschnitt werden die bisher gewonnenen Informationen über die Wirkungen von Chromverbindungen auf ganze Organismen und in Kurzzeittests dargestellt, um dann im Zusammenhang mit meinen Ergebnissen die Frage der möglichen Mechanismen der Chrom-Genotoxizität in der Diskussion wieder aufzugreifen.

1.2 Toxikologie der Chromverbindungen

Kenntnisse über die Wirkung von Chromverbindungen in lebenden Systemen wurden einerseits aus epidemiologischen Untersuchungen und Tierversuchen gewonnen. Zum zweiten lieferten verschiedene Kurzzeittests nähere Informationen über die Vorgänge auf zellulärer und molekularer Ebene.

Belastungen mit Chromverbindungen am Arbeitsplatz in chromaterzeugenden und chromverarbeitenden Industrien (Farbstoffe, Verchromung, Schweißen und Schleifen von Chrom-Nickel-Stählen) stehen in ursächlichem Zusammenhang mit Krebserkrankungen der Luftwege. Daneben wurden auch andere Schädigungen an Leber und Nieren festgestellt (NIOSH, 1975). Am Arbeitsplatz liegen in der Regel Belastungen mit Gemischen löslicher und unlöslicher Verbindungen des drei- und des sechswertigen Chroms vor, so daß der beobachtete Effekt nicht einer bestimmten Verbindung zugeordnet werden kann. Trotzdem werden Chrom(III)-Verbindungen von der Mehrheit der Autoren nicht als krebserregend angesehen; das wird durch epidemiologische Untersuchungen der Gerberei-Industrie unterstützt, wo nur mit dreiwertigen Chromverbindungen gearbeitet wird. Dort wurden Hautsensibilisierungen und allergische Reaktionen beobachtet, aber keine Erhöhung der Krebshäufigkeit.

In Tierversuchen kann demgegenüber sowohl mit industriellen Produkten als auch mit reinen Substanzen gearbeitet werden. Kalziumchromat erzeugt in Ratten unabhängig von der Applikationsform Tumore in der Lunge. Chromate der Metalle Sr, Zn, Na und Pb und das Chromtrioxid (CrO_3) rufen lokale Tumore am Applikationsort hervor (Lee, 1987). Es wurde festgestellt, daß die schwach löslichen Chromate ein höheres krebserzeugendes Potential besitzen als die leicht und die praktisch unlöslichen. Eine Untersuchung von Steinhoff et al. (1986) zeigte, daß die intratracheale Applikation von leicht löslichem Natriumchromat bei Ratten nur in der höchsten getesteten Dosis (1,25 mg Cr/kg Körpergewicht/Woche) die Krebshäufigkeit erhöhte. Wenn diese Dosis auf 5 Tage aufgeteilt wurde, (0,25 mg

Cr/kg/Tag), blieb der Effekt aus. Daraus ergibt sich, daß die einzelnen Chromverbindungen sich nicht nur in ihrem krebserzeugenden Potential unterscheiden, sondern auch die Testbedingungen von großer Bedeutung für das Testergebnis sind. Mit dreiwertigen Chromverbindungen konnten in Experimenten mit Tieren keine Tumore erzeugt werden, aber sie haben auch unterschiedliche Potentiale in der Auslösung allergischer Reaktionen, was von der Ligandenbindung abhängt (Lee, 1987). Obwohl dreiwertiges Chrom im Versuchstier nicht carcinogen ist, haben Untersuchungen zur Verteilung von Chromverbindungen im Organismus gezeigt, daß beide Formen des Chroms in Leber-, Nieren- und Lungenzellen akkumulieren (Hopkins, 1965) und bei beiden Formen konnte eine Bindung an das Chromatin dieser Zellen gemessen werden (Cupo und Wetterhahn, 1985; Edel und Sabbioni, 1985). Die Verteilung i.v. injizierten $^{51}\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ über das Blutplasma und die Absorption durch Leber und Milz wurde auch beim Menschen gemessen (Lim et al., 1983).

Die Untersuchung auf Chromatinschädigungen nach i.p. Injektion in Versuchstiere ergab, daß in Leber-, Nieren- und Lungenzellen DNA-Interstrang-Vernetzungen hervorgerufen wurden, aber mit je nach Organ unterschiedlichen Zeiten des Entstehens und Verschwindens. Durch Injektion von dreiwertigem Chrom konnten diese Schäden nicht erzeugt werden (Tsapakos et al., 1983; Cupo und Wetterhahn, 1985). Zusätzliche Informationen über die vielfältigen Wirkungen von Chromverbindungen in der Zelle ergaben sich aus verschiedenen Kurzzeittests, die teilweise erst in den letzten Jahren entwickelt worden sind. In relativ kurzer Zeit kann die Aufnahme und Verteilung von Substanzen in Zellen gemessen werden, kann man die Auswirkung auf die Lebensfähigkeit, Mutations- und Transformationsraten bestimmen und die Beeinflussung anderer Stoffwechselvorgänge untersuchen.

Mit menschlichen Erythrozyten als Modellsystem wurde die Aufnahme von Chromverbindungen untersucht. Das sechswertige Chromat gelangt schnell durch den Anionentransportkanal in die Zellen und wird dort reduziert und als dreiwert-

tige Chromverbindung akkumuliert (Beyersmann et al. 1984). Für das dreiwertige Chrom existiert dagegen kein carriervermittelter Aufnahmemechanismus, aber auch keine absolute Impermeabilität, wie im allgemeinen angenommen wurde. Allerdings müssen im Vergleich zu Chromat etwa 1000-fach höhere Konzentrationen im Außenmedium angeboten werden, um gleiche intrazelluläre Chromkonzentrationen zu erreichen (Kortenkamp et al., 1987).

Wie schon in ganzen Tieren konnten auch in Zellkultur-Untersuchungen DNA-Schädigungen durch sechswertiges Chrom induziert werden. Bereits nach 5 stündiger Inkubation mit geringen Konzentrationen von 5 μ M Chromat wurden in Hühnerembryo-Hepatozyten Interstrang- und DNA-Protein-Vernetzungen gefunden (Cupo und Wetterhahn, 1984), in CHO-Zellen wurde die Bildung alkali-labiler Stellen gemessen (Cantoni und Costa, 1984). Die Beseitigung der DNA-Brüche und Vernetzungen mit Hilfe von Reparaturprozessen wurde sowohl in Zellkultur als auch in Tierexperimenten gezeigt (Cupo und Wetterhahn, 1984; Hamilton und Wetterhahn, 1986). Elias und Mitarbeiter (1983) fanden Erhöhungen der Schwesterchromatidaustausche bei V79 Zellen des Chinesischen Hamsters nach Inkubation mit sechs- und dreiwertigem Chrom. Allerdings waren beim dreiwertigen Chrom 300 bis 1000 fach höhere Konzentrationen notwendig oder aber längere Inkubationszeiten, was wahrscheinlich mit der geringeren Aufnahme in die Zellen zusammenhängt.

Die Erhöhung der Mutagenitätsrate ist ein weiterer Hinweis darauf, daß ein Stoff direkt oder indirekt auf das Genom wirkt. Es hat sich gezeigt, daß Chromat im Bakterientest mutagen ist, dreiwertiges Chrom dagegen nicht (DeFlora et al., 1984) oder nur unter bestimmten Bedingungen, z.B. wenn es mit lipophilen Liganden (Warren et al., 1981a) und Aminosäuren (Gentile et al., 1981; Langerwerf et al., 1985) komplexiert vorliegt. Auch in Hefezellen konnte ein mutagener Effekt gezeigt werden, der aber vom Puffer abhängig war (Galli et al., 1985). Die Mutagenität von Chromat wurde auch in Säugetierzellen untersucht. Paschkin und Mitarbeiter (1983) fanden Erhöhungen der Mutagenität

am HGPRT-Lokus in V79 und in CHO Zellen, wobei die ersteren empfindlicher waren. Dreiwertiges Chrom wurde in diesem System bislang noch nicht untersucht.

Die Feststellung, daß das sechswertige Chrom nach seiner Aufnahme in Zellen reduziert wird und als dreiwertiges an Zellbestandteile, unter anderen auch Zellkerne (Langard, 1979), gebunden vorliegt, läßt vermuten, daß das dreiwertige Chrom die genotoxisch wirksame Form ist. Untersuchungen an subzellulären Systemen unterstützen diese Vermutung.

Versuche von Fornace und Mitarbeitern (1981) brachten erste Hinweise auf Cr(III)-induzierte DNA-Protein-Vernetzungen an isolierten Zellkernen. Auch die Komplexierung von Nucleotidtriphosphaten und die Hemmung ATP-abhängiger Enzyme (Dunaway-Mariano und Cleland, 1980) geschieht durch

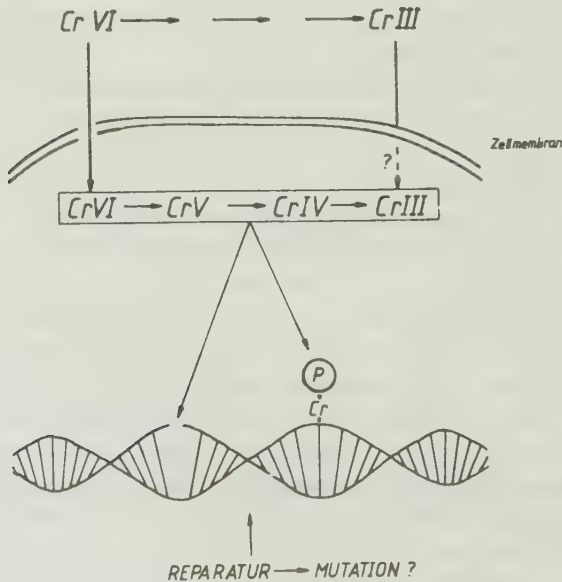


Abb. 4: Modell der Chromgenotoxizität, "Aufnahme-Reduktions-Modell"

dreiwertiges, nicht durch sechswertiges Chrom. Es reagiert auch mit Nucleinsäurebasen und Phosphatgruppen und destabilisiert durch Vernetzungen zwischen Basen und Basen sowie Basen und Phosphatgruppen die DNA-Struktur (Tamino et al., 1981). Isolierte DNA geht stabile Komplexe mit Chrom ein, wenn es als sechswertiges angeboten wird, aber nur in Anwesenheit eines reduzierenden Systems (Tsapakos und Wetterhahn, 1983) oder aber als dreiwertiges Chrom (Balbi et al., 1981).

In der Literatur werden folgende Vorstellungen über genotoxische Wirkungen des Chroms diskutiert: Sechswertige Chromverbindungen werden über den Anionenkanal von Zellen aufgenommen und werden danach im Zellinneren zum dreiwertigen reduziert. An der DNA entstehen Strangbrüche und Vernetzungen. Welche Oxidationsstufe des Chroms dafür verantwortlich ist, ist bisher noch nicht geklärt. Aus fehlerhafter Reparatur dieser Schäden und während der DNA-Replikation können dann Mutationen entstehen (Abb. 4).

2

Problemstellung

Die in der Einleitung dargestellten Kenntnisse über die Wirkung von Chromverbindungen lassen vermuten, daß die mutagenen und carcinogenen Chromate nicht selbst genotoxisch wirken, sondern im Verlauf biochemischer Reaktionen in der Zelle erst die wirksamen Verbindungen entstehen. Eine direkte Identifikation dieser Verbindungen in der Zelle ist noch nicht gelungen. Deshalb soll mit Untersuchungen auf verschiedenen Organisationsebenen der Zelle mit Chromverbindungen unterschiedlicher Oxidationsstufen ein Beitrag zur Klärung des Mechanismus der Chromgenotoxizität geleistet werden.

Da denkbar ist, daß die nach Chromatinkubation beobachteten DNA-Schädigungen auf direkten Wechselwirkungen des Chroms mit der DNA beruhen, sollte die DNA als isolierte Form, verpackt im Chromatin isolierter Zellkerne und in intakten Säugetierzellen auf mögliche Schädigungen durch Chromverbindungen untersucht werden. Dabei spielt die Zugänglichkeit der DNA eine entscheidende Rolle, der bei intakten Zellen wesentlich mehr Barrieren gesetzt sind als bei isolierten Kernen oder DNA. Andererseits fehlt bei isolierter DNA der Stoffwechsel der Zelle, der eine Voraussetzung für die Bildung genotoxisch wirksamer Metabolite sein kann.

So sind möglicherweise für die mutagenen Wirkungen des Chromats die intrazellulär gebildeten Chrom(III)-Verbindungen verantwortlich. In Mutations-Tests mit Chrom(III)-Verbindungen hat man aber widersprüchliche Ergebnisse erhalten. Diese werden auf die schlechte Permeabilität der Zellmembran für dreiwertige Chromverbindungen zurückgeführt.

In dieser Arbeit sollte sowohl die Wirkung sechswertiger mit der Wirkung dreiwertiger Chromverbindungen als auch verschiedene dreiwertige Chromkomplexe untereinander verglichen werden. Als dreiwertige Chromverbindungen sollten die im Ames-Test wirksamen Komplexe mit den lipophilen Liganden o-Phenanthrolin und Bipyridin untersucht

werden, sowie das in fast allen bisher durchgeführten Untersuchungen verwendete Chromtrichlorid. Außerdem stand ein Komplex mit der Aminosäure Glycin als Ligand, ein Modell für einen möglichen in der Zelle gebildeten Komplex, zur Verfügung.

Es besteht die Frage, ob dreiwertiges Chrom über die Bildung stabiler Komplexe mit isolierter DNA hinausgehend auch die Bildung von Einzelstrangbrüchen induzieren kann, wie sie in DNA ganzer Zellen nach Chromateinwirkung festgestellt worden sind. Da aber auch die Möglichkeit nicht auszuschließen ist, daß ein Teil des Chromats der Reduktion im Cytoplasma entgeht und zur DNA vordringt, sollte ebenfalls die Chromatwirkung auf isolierte DNA untersucht werden. Dafür steht mit dem Strangbruchtest an isolierter superhelikaler Phagen-DNA ein empfindliches Meßsystem zur Verfügung.

Bei isolierten Zellkernen und Säugetierzellen sollte zunächst geklärt werden, ob und wie schnell verschiedene dreiwertige Chromkomplexe gebunden bzw. aufgenommen werden, bevor eventuell hervorgerufene biologische Effekte untersucht werden. DNA-Schädigungen bei isolierten Kernen und bei Säugetierzellen, wie Einzelstrangbrüche und DNA-Protein-Vernetzungen, sind ein möglicher Endpunkt, der mit der Alkalischen Elution untersucht werden sollte. Weitere Effekte auf die Zelle wie Cytotoxizität und Mutagenität können durch Schäden an der DNA, aber auch durch andere Wechselwirkungen verursacht werden und sollten bei den intakten Zellen getestet werden.

Dabei geht es nicht nur um das Ziel, genauere Vorstellungen über die Stoffwechselvorgänge in der Zelle nach Einwirkung der Chromverbindungen zu erhalten, sondern auch um die Frage, ob dreiwertige Chromverbindungen als ungiftig angesehen werden können und daher für Mensch und Umwelt keine Gefährdung darstellen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Lösungen

Alle eingesetzten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.A. und wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen, soweit keine anderen Angaben gemacht sind. Rinderserumalbumin und Nonidet P-40 sowie Ethidiumbromid und Seakem Agarose stammten von Serva, Heidelberg. Kalbsthymus-DNA und DNA-Polymerase I aus E. coli wurden bei Boehringer, Mannheim gekauft. Herings-Sperma-DNA, Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH), Hoechst 33258, deoxy-Nucleotid-Triphosphate der Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin wurden von Sigma, München geliefert. Bei Gibco, Karlsruhe wurde α -MEM, fötales Kälberserum sowie Trypsin- und Penicillin-Streptomycin Lösungen gekauft. Fungizone Squibb stammte von Flow Laboratories, Meckenheim. Die radioaktiven Substanzen [methyl- ^3H]Thymin und [5- ^3H]-deoxy-Cytidintriphosphat stammten von Amersham Buchler, Braunschweig und Quickzint 212 von Zinsser, Frankfurt. Tiefgefrorenes Kalbsthymusgewebe wurde beim Schlachthof in Bremen gekauft. Die Chromkomplexe $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$ und $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$ wurden uns freundlicherweise von Dr. Abbott, Montana State University, USA und $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]$ von Dr. O'Brien, Queen Mary College, University of London, zur Verfügung gestellt.

Ein Spectroline Transilluminator Model TR 302 und ein Chromoscan Scanning Densitometer (Joyce Loebl Ltd., England) wurde bei der Auswertung der Gelelektrophorese benutzt. Für den fluorimetrischen Nachweis der DNA wurde ein Spectrophotofluorometer (Aminco, Maryland, USA) und für die Chrombestimmung ein Graphitofen Atomabsorptionsspektrophotometer 2380 (Perkin Elmer, Überlingen) verwendet. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit einem Flüssigkeits-Scintillationsmeßgerät LS 8000 von Beckman (München). Sämtliche radioaktive Proben wurden in Scintillationsflaschen von Zinsser (Frankfurt) und mit Scintillations-Cocktail Quickzint 212 von Zinsser vermesen. Bei der Röntgenbestrahlung der Zellen wurde als Strahlenquelle ein Philips RT 250 (Eindhoven, NL) einge-

setzt. Die Zellkulturgefäße stammten von Nunc, Wiesbaden. Zur Sterilfiltration wurden Sartorius-Membranfilter mit 0,2 µm Porengröße verwendet. Bei der DNA-Untersuchung wurden Polyvic-Membranfilter (BSWP 04700, Millipore, Eschborn) und bei der Alkalischen Elution Nitrozellulose-Filter (SSWP 02500, Millipore) eingesetzt. Die Filterhalter stammten von Nuclepore (Tübingen), die Pumpe IPN 12 von ismatec (Zürich). Beim Nick-Translations-Test wurden Whatman Glasfaser-Filter GF/C (Ferrieres, Frankreich) eingesetzt.

Zum Ansetzen aller Lösungen wurde ausschließlich bidestilliertes Wasser verwendet. Die Metallverbindungen wurden in den jeweils angegebenen Puffern vor Versuchsbeginn frisch gelöst. $[\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ liegt in wässriger Lösung als $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ vor und wird im folgenden so benannt.

Die wichtigsten verwendeten Lösungen sind hier aufgeführt:

Versuche mit isolierter PM 2 DNA:

INKUBATIONSPUFFER: 0,015 M HEPES/0,15 M NaCl; pH 7,0

ABSTOPPER-LÖSUNG: 10% SDS, 0,04% Bromphenolblau, 45% Glycerin

ELEKTROPHORESE-PUFFER: 89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 25mM EDTA

Versuche mit isolierten Kalbsthymuskernen:

ZELLKERNPUFFER: 10 mM Tris-Base, 0,25 mM Saccharose, 10 mM MgCl_2 , 50 mM NaHSO_3 ; pH 6,5

AUFSCHLÜßSÄURE: 1:1 Mischung von 65% HNO_3 mit 30 % H_2O_2 , bei- des suprapur

LYSE-LÖSUNG FÜR EINFACHEN FILTERBINDUNGSTEST: 2 % SDS, 0,025 mM EDTA, 0,1 M Glycin

Alkalische Elution:

LYSE-LÖSUNG FÜR THYMSKERNE: 0,2% Triton, 2M NaCl, 0,02M EDTA; pH 10

LYSE-LÖSUNG FÜR V79-ZELLEN: 2% SDS, 25 mM EDTA; pH 10
WASCHLÖSUNG: 0,02M EDTA; pH 10

ELUTIONSLÖSUNG: 0,02M EDTA Säureform, Tetraäthylammonium hydroxid; pH 12,5 oder wie angegeben

Nick-Translations-Test:

NICK-ASSAY-PUFFER: 50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 10 mM MgSO_4 ,

0,1 mM Dithiothreitol, 50 µg/ml Rinderserumalbumin
ASSAY MIX: je 0,05 mM dATP, dGTP und TTP sowie 5 µCi/ml
[5-³H]dCTP, 40 Units DNA Polymerase I auf 1 ml mit Nick-
Assay-Puffer aufgefüllt.

DNA-FÄLLUNG: 10% Trichloressigsäure mit 1% Pyrophosphat

Zellkultur:

Für die Kultur der Hamsterzellen wurden sämtliche Lösungen
sterilfiltriert bzw. autoklaviert.

KULTURMEDIUM: α-MEM, gepuffert mit 2,2 g NaHCO₃/l, mit 10%
fötalem Kälberserum, supplementiert mit den Antibiotika
Penicillin (100E/ml) und Streptomycin (100ug/ml) sowie dem
Fungizid Fungizone (1,3 ug/ml)

PBS (PHOSPHAT-BUFFERED-SALINE): 8000mg NaCl, 200mg KCl,
1440mg Na₂HPO₄ · 2H₂O, 200mg KH₂PO₄ pro Liter; pH 7,4

TRYPSINLÖSUNG: 0,25% Trypsin (Gibco, Karlsruhe) in PBS
mit 200ug EDTA/ml

ZELLKERNEXTRAKTIONSPUFFER: 10mM Tris, pH 7,5 mit 3mM
MgCl₂ und 10mM NaCl

3.2 Versuche an isolierter superhelikaler DNA

Zur Untersuchung der Wirkung von Chromverbindungen auf isolierte DNA wird superhelikale Bakteriophagen-DNA (PM 2) verwendet, an der Einzelstrangbrüche nachgewiesen werden können (Hecht, R. und Thielmann, H.W., 1978). Diese Versuche wurden an der Universität Oldenburg mit Unterstützung der Arbeitsgruppe von Dr. Irene Witte durchgeführt, die auch die PM 2 DNA zur Verfügung stellte.

Inkubation und Abstoppen der Inkubation: 10 μ l einer DNA-Lösung von 20 μ g/ml werden mit 10 μ l einer Lösung der Chromverbindungen in HEPES/NaCl bei 0°C gemischt und 2 Stunden bei 37°C in Eppendorfgläsern inkubiert. Als Positivkontrolle wird Tetracyclin zur Einführung von Strangbrüchen benutzt (1,5mM Tetracyclin in 50 mM Tris-HCl Puffer, pH 7,5).

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Reaktion mit 5 μ l der Abstopper-Lösung bei 0°C beendet. Jeder Meßpunkt wird als 3-fach Bestimmung durchgeführt.

Horizontale Gelelektrophorese: Für die Elektrophorese wird ein 1% Agarose-Gel vorbereitet, in dessen Taschen vorsichtig 23 μ l Proben pipettiert werden. Nach ca. 15 Minuten, in denen die Proben vollständig in die Taschen sinken, wird 5 Stunden bei 80 V getrennt. Nach dem Elektrophoreselauf wird die DNA im Gel in einer frisch angesetzten Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) 1 Stunde im Dunkeln gefärbt und 30 Minuten in Leitungswasser gewässert. Nach dem Anfärben wird das Gel auf den Transilluminator gelegt, bei 302 nm bestrahlt und zugleich fotografiert.

Quantitative Auswertung: Ethidiumbromidgefärbte DNA ist bei UV-Licht instabil, daher kann nicht die Probe direkt zur Auswertung herangezogen werden, sondern das Foto wird einer Reflektionsmessung unterzogen. Die auf dem Foto erscheinenden hellen Banden reflektieren das sichtbare Licht stärker als der dunkle Untergrund. Mit einem schmalen

Lichtspalt werden die Banden abgefahren und die Menge des reflektierten Lichts in Form von Kurven grafisch aufgezeichnet. Anschließend werden die Peakflächen halbautomatisch mit einem Integrator bestimmt.

Es wird angenommen, daß die Verteilung der Brüche auf den DNA-Molekülen einer Poisson-Verteilung folgt. Aus dem Anteil der Moleküle ohne Bruch (α) wird die Durchschnittliche Anzahl der Brüche pro PM 2 DNA-Molekül nach der Formel

$$N = -\ln \alpha = -\ln \frac{\text{untere Bande}}{\text{untere Bande} + 0,8 \cdot \text{obere Bande}}$$

berechnet. 0,8 muß als Korrekturfaktor in die Formel eingeführt werden, da sich die relaxierte DNA-Form besser färben läßt als die superhelikale Form.

3.3 Versuche mit isolierten Kalbsthymuszellkernen

3.3.1 Präparation der Zellkerne aus Kalbsthymusgewebe

Alle Schritte der Präparation werden im Eisbad und mit eisgekühlten Lösungen durchgeführt. 5g gefrorenes Kalbsthymusgewebe (vom Schlachthof) wird in kleine Stücke geschnitten, 2 mal mit 10 ml Zellkernpuffer (ZKP) gewaschen, in 10 ml ZKP aufgenommen und im Omnimix (Sorvall) sehr kurz (1 mal ca. 5 sec.) homogenisiert und durch ein Tuch filtriert. Die Zellkerne werden in der Heraeus Minifuge bei 1000 rpm (160 g) sedimentiert und dreimal mit ZKP gewaschen, indem sie in ZKP resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert werden. Die Zahl der Zellkerne wird mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf $6 \cdot 10^7$ Kerne/ml verdünnt.

3.3.2 Chromaufnahme und Bindung an Kalbsthymuskern

Alle Inkubationen und Messungen werden als Doppelbestimmungen durchgeführt. $3 \cdot 10^7$ Kerne werden in 1 ml ZKP mit verschiedenen Konzentrationen von $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ bzw. $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ bei 37°C inkubiert. Im Inkubationsansatz mit Chromat fehlte das Reduktionsmittel NaHSO_3 , das sonst im Zellkernpuffer enthalten ist. Nach Inkubationszeiten von 10, 30 und 60 Minuten werden die Zellkerne durch Zentrifugieren gesammelt und zweimal in ZKP gewaschen. Proben der Zellkernsedimente werden mit Aufschlußsäure über Nacht bei 95°C mineralisiert und in 1 ml 0,2% HNO_3 wieder aufgenommen. Die Chromkonzentrationen werden im Perkin-Elmer Atomabsorptionsspektralphotometer mit flammenloser Atomisierung im pyrobeschichteten Graphitrohr, ausgerüstet mit L'Vov Plattform, bestimmt.

3.3.3 DNA-Filterbindungstest

Zur Untersuchung der Chrom-Wirkung auf das Chromatin der Thymuskern wird ein DNA-Filterbindungstest von Hsia et al. (1983) so modifiziert, daß auch die Chrom-Bindung an das Chromatin gemessen werden kann. $3 \cdot 10^7$ Thymuskern/ml werden bei 37°C 15 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen von $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ inkubiert, anschließend zweimal mit Zellkernpuffer (ZKP) gewaschen und in 2ml ZKP resuspendiert. Diese Suspension wird durch ein Polyvic-Filter (Millipore BSWP 04700) mit $2\mu\text{m}$ Porengröße filtriert. Die auf dem Filter zurückgehaltenen Zellkerne werden mit 10 ml ZKP gewaschen und dann mit 10 ml Lyselösung lysiert. Die Lyselösung kann 10 Minuten einwirken, wird dann mit Vakuum durch das Filter gesaugt, welches noch mit 3 ml Lyselösung gewaschen wird. Danach werden die Filter in kleine Stücke geschnitten, in kleine Plastikgefäße überführt und die DNA mit 1 ml 1N HNO_3 bei 60°C 1 Stunde abgelöst. Proben von 0,2 ml werden daraus entnommen, eingedampft und in 1 ml 0,1% HNO_3 aufgenommen und der Chromgehalt im AAS wie

oben angegeben bestimmt. Der DNA-Gehalt der Proben wird mit Diphenylamin nach der Methode von Burton (1968) gemessen. Zum Abbau des DNA-gebundenen Proteins wird der Lyselösung 0,15 mg Proteinase K pro ml zugesetzt, die 1 Stunde bei Raumtemperatur einwirken kann.

3.3.4 Alkalische Elution der Chrominkubierten Thymuskern

Zur Untersuchung der Chromwirkung auf das Chromatin wurde die Methode der Alkalischen Elution nach Kohn et al. (1976) und nach praktischen Hinweisen von Dr. Schwarz (DKFZ, Heidelberg) aufgebaut.

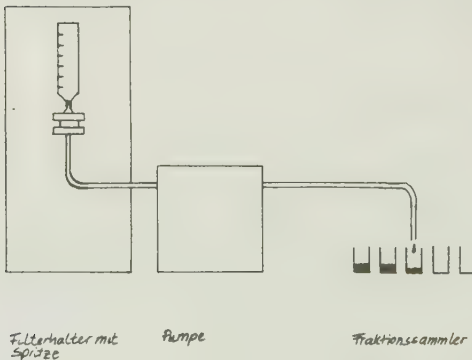


Abb. 5: Schematische Darstellung der Elutionsanlage

Die Anlage: In einem lichtundurchlässigen Kasten 8 Filterhalter (Nuclepore) angebracht, in die Membranfilter mit einem Durchmesser von 25 mm mit einer Porengröße von 3 μ m (Millipore, SSWP 02500 aus Nitrozellulose) eingelegt werden. Auf die Filterhalter werden 20 ml Spritzen gesteckt, die als Vorratsbehälter für die Lösungen dienen. Die Ausgänge der Filterhalter sind über Teflonschläuche an einen Fraktionssammler angeschlossen, der in 30 Minuten Inter-

vallen die Gefäße wechselt. Der Transport der Lösungen erfolgt über eine 12 Kanal-Schlauchpumpe (ismatec, IPN 12), die für den gleichmäßig langsamen Transport besonders geeignet ist. Der Aufbau der Anlage ist in der Abbildung Nr. 5 skizziert.

Der Ablauf der Elution: Die Anlage wird vorbereitet, indem sie mit eiskaltem Puffer so gespült wird, daß keine Luftblasen mehr im System sind, vor allem nicht unterhalb der Filter, da Luftblasen DNA-Stränge abscheren können. Die folgende Tabelle zeigt, wie die Anlage beschickt wird:

Tab. 1: Ablauf der Alkalischen Elution

Nr.	Schritt	Pumpengeschw.
1.	Auftrag der Zellkernsuspension, so daß 10 ⁶ Kerne/Filter vorliegen	0,2 ml/min
2.	Spülen mit 3 ml eiskaltem Puffer, um die Kerne möglichst gleichmäßig auf dem Filter zu verteilen	"
3.	Lyse der Zellkerne mit 5 ml Lysislösung	"
4.	Waschen mit 10 ml Waschlösung zur Entfernung kleinerer Moleküle (Membranreste etc.) sowie Detergenzreste. Das Eluat des Waschschrilles wird getrennt aufgefangen	"
5.	Elution mit 20 ml Elutionslösung	0,04 ml/min

Fluorimetrische Bestimmung des DNA-Gehaltes: Nach Ablauf der Elution werden die DNA-Gehalte in den Fraktionen, auf dem Filter und in der Anlage fluorimetrisch mit dem Hoechst-Farbstoff 33258 bestimmt. Vom Farbstoff wird eine Stammlösung mit einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ in bidestilliertem Wasser hergestellt, deren Konzentration im UV-Vis-Spektralphotometer über den Extinktionskoeffizienten unbedingt kontrolliert werden muß. Eine Eichgerade mit Thymus-DNA im Konzentrationsbereich 0,1 bis 2 µg/ml wird erstellt. Dafür werden 1 ml DNA-Lösung und 1 ml Phosphatpuffer, pH 6,0 und 1 ml verdünnte Farbstofflösung ($1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ in Phosphatpuffer, pH 7,3) gemischt, 15 min im

Dunkeln reagieren lassen, und dann bei 450 nm Emission und 360 nm Excitation im Aminco-Bowman Spektrofluorometer mit einer Spaltbreite von 4 nm vermessen.

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes des Wascheluates und in den Fraktionen wird 1 ml pro Fraktion mit 1 ml des Phosphatpuffers pH 6,0 und 1 ml Farbstofflösung gemischt und die Fluoreszenz gemessen. Der DNA-Gehalt der Filter wird ermittelt, indem die DNA vom kleingeschnittenen Filter 4 Stunden mit 6 ml Elutionslösung gelöst wird und 1 ml dieser Lösung wie oben vermessen wird. Die Anlage wird nach Entnahme der Filter mit 4 ml Elutionslösung gespült und 1 ml von dieser anschließend gemessen.

Die Berechnung der Elutionskurven erfolgt, indem die gemessenen DNA-Gehalte auf die jeweiligen Ausgangsvolumina hochgerechnet und danach die Gesamtmenge an DNA ermittelt wird. Die Gesamtmenge wird als 100% gesetzt und der prozentuale Anteil DNA pro Fraktion bzw. der auf dem Filter zurückgehaltene Anteil berechnet.

3.3.5 Nick-Translations-Test

Mit Hilfe des Nick-Translations-Tests kann DNA auf Einzelstrangbrüche mit freien 3'OH-Enden untersucht werden. Der Test nach Snyder und Matheson (1985) wurde für isolierte Thymuskerne modifiziert.

10 μ l einer Thymuskernsuspension mit $6 \cdot 10^7$ Kernen/10 μ l werden mit 10 μ l der Chromlösung bei 25°C 30 Minuten inkubiert. Im Anschluß daran wird der Assay-Mix zupipetiert, so daß jeder Meßpunkt ein Volumen von 100 μ l hat. In 100 μ l sind 0,5 μ Ci 3 H-dCTP sowie die unmarkierten Nucleosidtriphosphate dATP, dGTP und TTP (jeweils 0,05 mM) und 4 U DNA-Polymerase I in Assay-Puffer enthalten. Der Assay-Puffer wird mit 50 mM Tris-HCl auf pH 7,2 gepuffert und mit 10 mM $MgSO_4$, 0,1 mM Dithiothreitol und 50 μ g/ml Rinderserumalbumin supplementiert.

Nach 45 Minuten Reaktionszeit werden zur Bestimmung der eingesetzten Radioaktivität 10 μ l des Inkubationsansatzes

auf ein Whatman Glasfaserfilter (GF/C) pipettiert. Weitere 10 µl des Ansatzes werden in 5 ml TCA-Pyrophosphat-Lösung ergänzt mit 1 mg/ml Heringssperma-DNA pipettiert und 10 Minuten auf Eis stehengelassen und dann durch ein Whatman Glasfaserfilter filtriert, welches mit 2% Pyrophosphatlösung vorbenetzt ist. Zur Entfernung der nicht in die DNA eingebauten radioaktiven Nucleotide wird noch 5 mal mit 10 ml TCA-Pyrophosphatlösung gespült. Das Filter wird mit Äthanol gespült und getrocknet. Zur Bestimmung der Radioaktivität werden die Filter in Scintillationsfläschchen (Zinsser, Frankfurt) gegeben, mit 10 ml Scintillationscocktail Quickzint 212 versetzt und im Scintillationsmeßgerät (Beckman LS 8000) ausgewertet. Berechnet wurde für jede Probe der prozentuale Anteil der eingebauten von der eingesetzten Radioaktivität. Als Vergleiche werden bei jedem Versuch neben den chrominkubierten folgende Proben mit erstellt: Thymuskerne ohne Chrominkubation mit und ohne Polymerase I, aktivierte Thymuskerne (Schädigung der DNA durch Erhitzen auf 100°C für 10 Minuten und Abkühlen im Eisbad) mit und ohne Polymerase I. Jeder Meßpunkt wird als Doppelansatz erstellt.

3.4 Versuche mit Säugetierzellkulturen

3.4.1 Kultur von V79-Zellen des Chinesischen Hamsters

Die V-79 Zellen (von Dr. D. Gabel, Universität Bremen) werden als Monolayer in Plastikkulturgefäßen (Nunc, Wiesbaden) gezüchtet. Als Kulturmedium wird α -MEM mit 10% fötalem Kälberserum verwendet (vergl. 3.1). Die Inkubation erfolgt in einem Heraeus Brutschrank bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit. Die laufende Kultur wird nahezu bis zur Konfluenz gezüchtet, dann abtrypsiniert, indem zunächst das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen mit 1ml Trypsinlösung gespült und dann mit 0,5 ml frischer Trypsinlösung ca. 2 Minuten inkubiert wird. Wenn sich der Zellrasen vom Kulturgefäß gelöst hat, wird

mit Wachstumsmedium verdünnt und ein Teil der Zellen in ein neues Gefäß ausgesät.

3.4.2 Tieftemperaturkonservierung und Wiederauftauen der Zellen

Die Zellen werden stark vermehrt und ca. 10^6 Zellen/ml in α -MEM mit 20% fötalem Kälberserum im Eisbad gekühlt und 10% DMSO als Gefrierschutz zugegeben. Die Suspension wird in sterile Ampullen (Wheaton) überführt, welche zuge-schmolzen und in einer Polystyrolbox bei -20°C 12 Stunden und dann bei -80°C dauergelagert werden. Zum Auftauen der Zellen werden Kulturgefäße mit Wachstumsmedium mit 20% fö-talem Kälberserum vorbereitet, die Ampullen außen mit 70% Äthanol nach dem Auftauen sterilisiert und der Inhalt in das Kulturgefäß überführt. Nach 24 Stunden im Brutschrank wird das Medium gewechselt.

Die Ausbeute an lebenden Zellen kann erhöht werden, wenn die Zellen sofort in -80°C gelagert werden. Sterile Plastik-Kryoröhrchen mit Schraubverschluß erleichtern das schnelle Auftauen wesentlich.

3.4.3 Wachstumskurven der Zellen

Die Zellen werden in 8 Flaschen mit relativ niedriger Zelldichte ausgesät und inkubiert. In Abständen von etwa 24 Stunden werden je 2 Flaschen abtrypsiniert und die Zellzahl mit der Neubauerzählkammer ermittelt.

Eine Wachstumskurve setzt sich aus mindestens 3 Phasen zusammen: 1. Latenzzeit, in der sich die Zellen von der Trypsinierung erholen, sich an die neuen Kulturbedingungen anpassen und an die Unterlage anheften. 2. In der loga-rithmischen Wachstumsphase teilen sich die Zellen expo-nentiell. 3. In der dritten Phase verzögert sich das Wachstum, da Medium- und Platzkapazitäten langsam erschöp-fen. Vor dem Erreichen weiterer Phasen (stationärer Phase

mit dem Erreichen eines Gleichgewichtes zwischen Vermehrung und Absterben und den Regressionsphasen) werden die Zellen neu überimpft.

In der logarithmischen Wachstumsphase läßt sich die durchschnittliche Wachstumsrate mit folgender Formel berechnen:

$$k = \frac{\log N_t - \log N_0}{t \cdot \log_2}$$

wobei N_0 = Zahl ausgesäter Zellen

N_t = Zellzahl zum Zeitpunkt t

k = Regressionskonstante

t = Zeitpunkt in Stunden

Die Generationszahl n errechnet sich aus $k \cdot t$ und die Verdopplungszeit T ist k^{-1} .

3.4.4 Inkubation der Hamsterzellen

Von den verschiedenen Chromverbindungen werden 10 mM Stammlösungen in α -MEM vor jedem Versuch frisch angesetzt, die Chromverbindungen gelöst und mit α -MEM entsprechend verdünnt. Die Inkubation erfolgt stets mit logarithmisch wachsenden an die Kulturgefäße angehefteten Zellen und wird beendet durch Absaugen des Mediums, zweimaligem Waschen mit α -MEM. Danach werden die Zellen für die unten beschriebenen Untersuchungen weiterverwendet.

3.4.5 Permeabilisierung der Zellen

Zur Erleichterung der Aufnahme der Chromverbindungen in die Zellen sollten diese mit hypertonischem Medium reversibel permeabilisiert werden (Castellot, 1978).

Die an die Kulturschale angehefteten Zellen werden 4 mal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 4,2% NaCl-Zusatz in α -MEM 50 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wird das hypertonische Medium abgesaugt. Bei einem Teil der Zellen wird die Zellzahl ermittelt, bei einem anderen die Permeabilität für Trypanblau getestet und ein dritter Teil in isotonischem Medium nachinkubiert, um die Reversibilität der Permeabilisierung zu prüfen. Die Inkubation mit den Chromverbindungen erfolgt gleichzeitig mit der Permeabilisierung.

Prüfung der Lebensfähigkeit bzw. Permeabilisierung der Zellen mit Trypanblau: Der Farbstoff Trypanblau wird in der Zellkultur zur Bestimmung des Verhältnisses von lebenden zu toten Zellen verwendet. Die intakte Membran einer lebenden Zelle schließt den Farbstoff aus, die Membran einer toten Zelle ist permeabel und der Farbstoff kann an Moleküle in der Zelle binden. 90 μ l einer Zellsuspension werden mit 10 μ l einer 0,5% Trypanblau-Lösung gemischt und sofort wird das Verhältnis lebender zu toter Zellen mikroskopisch bestimmt.

3.4.6 Aufnahme von Chromverbindungen in die Hamsterzellen

Die Hamsterzellen werden wie oben beschrieben inkubiert, gewaschen und trypsiniert. Die Zellzahl wird durch Auszählung in der Zählkammer ermittelt. Je 500 μ l der Zellsuspension werden in der Eppendorffzentrifuge sedimentiert, der Überstand abgesaugt und mit 200 μ l Aufschlußsäure bei 95°C über Nacht aufgeschlossen. Die Rückstände werden in 1 ml 0,2% HNO_3 wieder aufgenommen und der Chromgehalt im AAS gemessen (vergl. 3.3.2).

Um festzustellen, wie fest das gemessene Chrom an die Zellen gebunden ist, werden die inkubierten Zellen nach dem Waschen noch 50 Minuten nachinkubiert und erst dann wie oben aufgeschlossen.

3.4.7 Präparation der Zellkerne aus Hamsterzellen und Messung des Chromgehaltes pro Zellkern

Aus den mit Chromverbindungen inkubierten Hamsterzellen werden die Kernfraktionen präpariert (Richter-Landsberg et al. 1985) und die Chromkonzentrationen bestimmt. Dadurch kann festgestellt werden, wie groß der Anteil des aufgenommenen Chroms vom Gesamt-Chrom der Zelle ist.

Die in den Kulturgefäßen mit und ohne Chromverbindungen inkubierten Zellen werden trypsiniert, 2 mal gewaschen, indem sie bei 300g abzentrifugiert und in kaltem PBS resuspendiert werden. Danach werden sie erneut sedimentiert und 10 Minuten in Zellkernextraktionspuffer mit 0,5% Nonidet P-40 im Eisbad lysiert. Das Lysat wird 10 Minuten bei 300rpm (30g) in einer Hettich Universal Zentrifuge Typ II abzentrifugiert und das Kernsediment im Zellkernextraktionspuffer resuspendiert. Die Kerne werden so noch 2 mal mit dem Puffer gewaschen und zum Schluß darin resuspendiert. Dabei müssen alle Lösungen und Geräte eiskalt sein, da sich die Kerne sonst verklumpen. Aliquots der Zellsuspension vor der Lyse und Aliquots der Kernsuspension werden zur Bestimmung der Zell- bzw. Kernzahl in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und mit Aufschlußsäure wie unter 3.3.2 beschrieben für die Chrom-Messung im AAS vorbereitet.

3.4.8 Cytotoxizität der Chromverbindungen

Cytotoxizitätstests lassen sich auf verschiedene Arten durchführen, wobei die Aussagefähigkeit der Tests unterschiedlich ist. Der Test auf akute Toxizität und der

Koloniebildungsfähigkeitstest werden im Zusammenhang zum HGPRT-Test durchgeführt.

Akute Toxizität: Von logarithmisch wachsenden Zellen wird das Kulturmedium abgesaugt, mit α -MEM 1 mal gewaschen und mit den Chromverbindungen in Zellkulturmedium inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Medium abgesaugt, die Zellen abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Die durch die Inkubation getöteten Zellen haben sich abgelöst und werden beim Absaugen des Mediums entfernt.

Kolonieüberlebens-Test: Die Zellen werden sehr dünn ausgesät (ca. 200 Zellen/Kulturgefäß) und 24 Stunden in Zellkulturmedium inkubiert. Danach werden sie mit den Chromverbindungen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Chrommedium entfernt, die Zellen 2 mal mit α -MEM gewaschen und in Zellkulturmedium inkubiert. Nach ca. 6 Tagen können die Kolonien gefärbt (vergl. 3.4.10) und ausgezählt werden. Da sich die Zellen in den 24 Stunden nach der Aussaat anheften und schon einmal teilen, bevor sie mit dem Schadstoff inkubiert werden, müssen je zwei Zellen geschädigt werden, damit ein Effekt sichtbar wird (Fehlen der Kolonie). Das setzt die Empfindlichkeit dieses Tests herab. Er ist nur geeignet für chronische Tests, bei denen der Schadstoff während der gesamten Koloniebildungszeit anwesend ist. Dieses Problem tritt nicht auf beim

Koloniebildungsfähigkeits-Test: Logarithmisch wachsende Zellen werden mit den Chromverbindungen inkubiert und sofort nach Beendigung der Inkubationszeit abtrypsiniert und in neue Kulturschalen dünn (ca. 200 Zellen/Kulturgefäß) ausgesät. Nach 6 Tagen können die gebildeten Kolonien gefärbt und gezählt werden.

Chronische Inkubation: Kulturschalen werden mit ca. 125 Zellen beimpft und mit Medium inkubiert, das die angegebenen Konzentrationen an Chromverbindungen enthält. Pro Konzentration werden drei Schalen angesetzt, für die Kontrolle ohne Chromkomplex 8 parallele Schalen. Nach 5 Tagen Inkubation werden die Kolonien gefärbt.

3.4.9 Alkalische Elution von Hamsterzellen

Radioaktive Markierung der Hamsterzellen:

Logarithmisch wachsende Zellen werden 24 Stunden mit Zellkulturmedium inkubiert, dem ^3H -Thymidin (Amersham Buchler) mit einer Aktivität von 0,1 $\mu\text{Ci/ml}$ Medium zugesetzt wird. Die Zellen metabolisieren das radioaktiv markierte Nucleotid, so daß bei der DNA-Neusynthese je ein radioaktiv markierter Tochterstrang entsteht. Nach der Inkubation mit Thymidin werden die Zellen mit den verschiedenen Chromverbindungen wie oben beschrieben inkubiert.

Bestrahlung der Zellen mit Röntgenstrahlen: Um in die DNA-Stränge statistisch verteilte Einzelstrangbrüche einzuführen, werden vor der alkalischen Elution Referenzzellen, die mit ^{14}C -Thymidin markiert werden, mit einer Röntgenquelle bestrahlt. Da an der Universität keine Strahlenquelle mit der notwendigen Energie zur Verfügung steht, mußten die Zellen zur nächsten geeigneten Strahlenquelle (Krankenhaus St.-Jürgen-Str.) transportiert werden. Die Kulturgefäße werden für den Transport mit Medium gefüllt und im Eisbad transportiert. Sie werden mit verschiedenen Strahlendosen zwischen 0 und 15 rad mit einem Philips RT 250 (150 kV, 20 mA, 0,35 Cu-Filter, Tubus: FHA 10 x 15/40 Feldgröße) bestrahlt. Pro gray = 100 rad wird 1,05 Minuten bestrahlt. Im Anschluß daran werden die Zellen wieder im Eisbad zurücktransportiert und sofort die Alkalische Elution durchgeführt. Die unbestrahlte Kontrolle wird ebenfalls mit transportiert.

Alkalische Elution: Die Elution wird wie unter 3.3.4 beschrieben durchgeführt, allerdings wird die Anlage vor dem Auftrag der Zellen luftblasenfrei mit eiskaltem PBS gefüllt. Pro Filter werden 10^6 Zellen aufgetragen und mit kaltem PBS gespült. Nach der Elution werden die Filter entnommen und in 3 ml Äthylenglykolmonoäthyläther aufgelöst. Die Anlage wird mit 3 ml Elutionslösung gespült. Je 1 ml dieser Spüllösung, der Fraktionen und die 3 ml mit lysiertem Filter werden mit je 9 ml Scintillationscocktail

(Quickzint 212, Zinsser) gemischt und die Radioaktivität im Scintillationsmeßgerät (Beckman LS 8000) gezählt.

Alkalische Elution mit Chrominkubation nach der Lyse: In einem weiteren Versuch wird die Chrominkubation nicht mit ganzen Zellen durchgeführt, sondern erst nach der Lyse der Zellen, wenn die DNA dadurch weitgehend isoliert vorliegt. Nach der Lyselösung werden die Filter mit je 7,5 ml Lösungen von $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ mit den Konzentrationen von 0,5, 1 und 2 mM 1 Stunde gespült, mit und ohne Proteinase K behandelt und anschließend wie oben beschrieben alkalisch eluiert.

3.4.10. Mutagenität der Chromverbindungen bei Hamsterzellen

Der Test auf Mutagenität von Chemikalien an Säugetierzellen am HGPRT-Lokus wird nach Hsie et al. (1979) mit V79-Zellen durchgeführt.

Inkubation, Expression und Selektion: Es werden ca. $5 \cdot 10^5$ Zellen in 10 cm Kulturschalen angesetzt, 24 Stunden wachsen gelassen und anschließend 24 Stunden mit den verschiedenen Chromverbindungen inkubiert. Das Inkubationsmedium wird dann entfernt, die Zellen trypsiniert und die erste Subkultur angesetzt. Gleichzeitig werden ca. 200 Zellen/6cm Kulturschale ausgesät, um die Cytotoxizität zu testen. Dieser Schritt ist der Beginn der Expressionsphase, in der dann nach 3 Tagen eine zweite Subkultur angelegt wird. Drei Tage später beginnt die Selektionsphase mit dem Überimpfen von ca. $2 \cdot 10^5$ Zellen in Kulturmedium mit 10 µg 6-Thioguanin/ml. Die genaue Zahl der ausgesäten Zellen wird durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer sowie die Lebensfähigkeit mit dem Koloniebildungsfähigkeitstest bestimmt. Pro Meßpunkt werden 4 Schalen angesetzt. Nach 5 bis 7 Tagen können die Kolonien der selektierten Mutanten und des Koloniebildungsfähigkeitstests gezählt werden. Als Positivkontrolle werden Referenzkulturen mit einer UV-Leuchtstoffröhre (Erlab) bei einer

Wellenlänge von 253,7 nm (15 Watt) nach Absaugen des Mediums 5 sec mit einer Intensität von 1 J/m² bestrahlt und wie oben behandelt.

Färbung der Kolonien: Nach 5 bis 7 Tagen sind die Kolonien mit bloßem Auge zu erkennen. Dann wird das Medium abgesaugt, die Schalen mit PBS gespült, dieser wieder abgesaugt und mit 0,25% Giemsa in 96% Äthanol gefärbt. Die überschüssige Farbstofflösung wird mit Leitungswasser entfernt.

Auswertung: Die Mutagenitätsraten werden sowohl für die eingesetzten Zellen als auch für die lebensfähigen Zellen berechnet. Die Mutagenitätsrate für die eingesetzten Zellen y_1 ergibt sich aus der Summe der Mutanten-Kolonien der 4 Schalen dividiert durch die eingesetzte Zellzahl pro Schale (N_0).

$$y_1 = \frac{M_1 + M_2 + M_3 + M_4}{4 \cdot N_0}$$

Um die Lebensfähigkeit (L) mit einzubeziehen, muß diese durch die Auswertung des Koloniebildungsfähigkeitstests mit eingerechnet werden:

$$L = \frac{L_1 + L_2}{2 \cdot L_0}$$

L_0 ist die Anzahl der gebildeten Kolonien bei der Kontrolle und L_1 und L_2 sind zwei parallele inkubierte Proben.

Die Mutationsrate bezogen auf die lebensfähigen Zellen (y_2) ergibt sich aus der Formel

$$y_2 = \frac{y_1}{L}$$

Die Mutagenitätsraten y_1 und y_2 werden für jeweils 10⁶ Zellen errechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Chromwirkung auf isolierte superhelikale DNA

Für das Verständnis der molekularen Wirkungsmechanismen der Chromverbindungen kann die Untersuchung ihrer Wirkungen auf isolierte DNA wichtige Hinweise liefern. Insbesondere Verbindungen des dreiwertigen Chroms stehen unter Verdacht, für die genotoxischen Wirkungen verantwortlich zu sein. Konformationsänderungen isolierter DNA wurden mit Chromtrichlorid beobachtet. (Österberg et al., 1984). Ob Strangbrüche, die nach Inkubation intakter Zellen mit Chromat meßbar sind, durch direkte Wechselwirkung von Chromat oder von Chrom(III)-Komplexen mit der DNA ausgelöst werden, sollte zunächst an isolierter DNA untersucht werden.

Mit der aus Bakteriophagen gewonnenen PM2-DNA liegt für die Messung von Strangbrüchen ein empfindliches Testsystem vor (Seawell und Ganesan, 1981). Der Supercoil relaxiert zur ringförmigen DNA, wenn nur ein Einzelstrangbruch eingeführt wird. Ab einer höheren Bruchfrequenz entsteht lineare DNA. Diese Formen lassen sich in der Gelelektrophorese voneinander trennen und aus quantitativen Auswertungen der Bandenintensitäten kann die durchschnittliche Strangbruchfrequenz ermittelt werden. Eine Erhöhung von 0,1 Strangbrüchen pro Molekül ist signifikant. Das Maximum ist bei einer durchschnittlichen Strangbruch-Frequenz von 1 pro Molekül erreicht.

Die PM2-DNA wurde mit 1 mM Lösungen der Chrom(III)-Komplexe $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$, $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ und mit Chromat 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Jeder Meßpunkt wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die quantitative Analyse ist in Tabelle 2 dargestellt. Sie ergab, daß weder die Inkubation mit dreiwertigen noch mit sechswertigem Chrom im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und zur Positivkontrolle mit 1,5 mM Tetracyclin zu einer signifikanten Erhöhung der Strangbrüche führt. $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ kann in diesem Test nicht ausgewertet werden, weil vermutlich eine Wechselwir-

kung dieses Komplexes mit der DNA deren Färbung mit Ethidiumbromid verhindert.

Tab. 2: Strangbrüche in isolierter superhelikaler DNA mit und ohne Chrominkubation. Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen

	Brüche/Molekül	Brüche/Molekül minus Kontrolle
Kontrolle	0,23	0
1mM $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$	0,32	0,09
1mM $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$	0,29	0,06
1mM $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$	0,32	0,09
1mM Na_2CrO_4	0,30	0,07
1,5 mM Tetracyclin	0,39	0,16

Zusammengefaßt ergibt sich, daß weder drei- noch sechswertiges Chrom unter den gewählten Testbedingungen bei isolierter superhelikaler DNA Strangbrüche induziert.

4.2 Chromwirkung auf isolierte Kalbsthymuszellkerne

Im Vergleich zu isolierter DNA bieten isolierte Zellkerne die Möglichkeit, die Chromwirkung auf einer höheren Organisationsebene zu untersuchen, denn sie enthalten bei schonender Isolation das intakte Chromatin, umgeben von der Kernmembran.

Säugetierzellkerne lassen sich mit hoher Ausbeute aus dem kernreichen Kalbsthymusdrüsengewebe isolieren. An ihnen sollte die Bindung von Chromverbindungen und deren Effekt auf das Chromatin der Zellkerne untersucht werden.

4.2.1 Chrombindung an isolierte Zellkerne

Die aus Kalbsthymusgewebe präparierten Zellkerne wurden mit $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ im Konzentrationsbereich 0.05 bis 1.0 mM und mit 0.1 und 0.5 mM Na_2CrO_4 bis zu 60 Minuten inkubiert, anschließend gewaschen und der Chromgehalt der Zellkerne mit Graphitrohr-AAS gemessen. Der Komplex ist im leicht sauren Zellkernpuffer löslich.

Die Abb. 6 zeigt, daß bei Chromatinkubation mit Konzentrationen bis zu 0,5 mM kein Chrom an die Zellkerne bindet. Demgegenüber ist schon bei 0,05 mM $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ eine

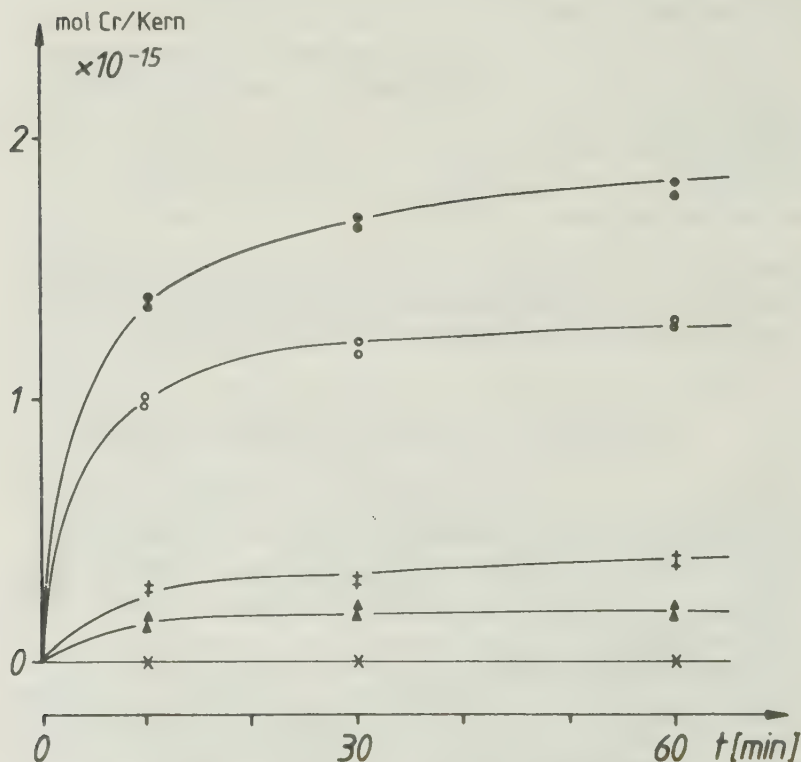


Abb. 6: Bindung von $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ und Na_2CrO_4 an isolierte Kalbsthymuszellkerne. Inkubation mit $\triangle$ 0,05mM, δ 0,1mM, $\circ$ 0,5mM, $\bullet$ 1mM $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ und $\times$ 0,1 oder 0,5mM Na_2CrO_4

signifikante Bindung feststellbar, die mit zunehmender Inkubationszeit und -dauer ansteigt. Das dreiwertige Chrom bindet schnell an die Kerne: Bereits nach 15 Minuten ist ca. 80% des nach 60 Minuten gebundenen Chroms an den Kernen nachweisbar. Nach 60 Minuten Inkubation ist eine Sättigung der Chrombindung annähernd erreicht.

4.2.2 Effekte auf das Chromatin der Zellkerne

4.2.2.1 Einfacher Filterbindungstest

Die Bindungsstudien haben gezeigt, daß nach 15 Minuten bereits ein großer Teil des dreiwertigen Chroms an den Kernen gebunden ist, so daß für die Untersuchung der Effekte auf das Chromatin diese Inkubationszeit gewählt wurde. Mit Hilfe des einfachen Filterbindungstests nach Hsia et al. (1983) konnte festgestellt werden, daß das

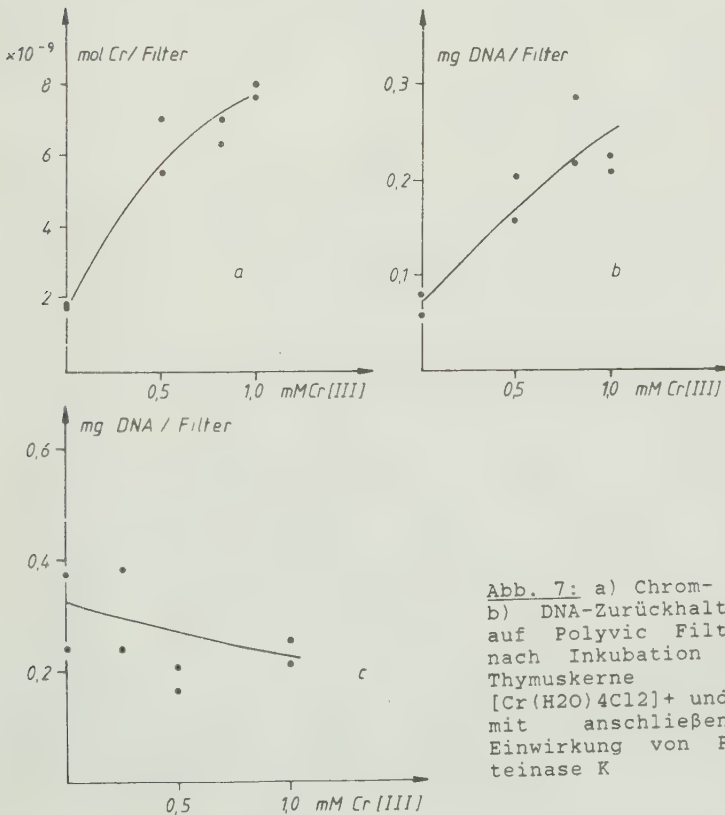


Abb. 7: a) Chrom- und b) DNA-Zurückhaltung auf Polyvic Filtern nach Inkubation der Thymuskerne mit $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ und c) mit anschließender Einwirkung von Proteinase K

gebundene Chrom das Chromatin der Kerne beeinflusst. Mit steigenden Chromkonzentrationen während der Inkubation steigen sowohl die DNA Mengen, die durch das Filter zurückgehalten werden, als auch die Chrommengen pro Filter.

Daraus läßt sich schließen, daß das dreiwertige Chrom Vernetzungen mit DNA in das Chromatin einführt, an denen es möglicherweise selbst beteiligt ist. Die Vernetzungen könnten zwischen verschiedenen DNA-Strängen und/oder DNA und Proteinen bestehen. Eine Behandlung der Filter mit Proteinase K eliminiert den Effekt der verstärkten DNA Zurückhaltung auf dem Filter, wie die Abbildung 7 zeigt. Daraus kann geschlossen werden, daß die DNA nur mit Proteinen vernetzt ist.

4.2.2.2 Alkalische Elution

Im Unterschied zum Filterbindungstest, bei dem nur die Zurückhaltung der DNA nach der Lyse der Zellen gemessen wird, erfolgt bei der Alkalischen Elution die Aufnahme eines DNA-Elutionsprofils. Während der Lyse der auf einem Membranfilter liegenden Zellkerne oder Zellen werden etwa 90% der Proteine und andere Zellbestandteile entfernt. Zurück bleibt die DNA, die aufgrund ihrer Moleküllänge kaum durch die Poren des Filters läuft. Bei der Elution mit alkalischen Lösungen bei pH-Werten ab 12,1 geht die DNA in die Einzelstrangform über. Die Grundannahme der Methode liegt darin, daß sich die Elutionsrate direkt proportional zur Molekülgröße verhält. Kleinere DNA-Einzelstränge eluieren in den ersten Fraktionen der Elutionslösung, während die größeren Moleküle erst später eluieren. Im Vergleich zu unbehandelter DNA können induzierte Strangbrüche sichtbar gemacht werden. Eine stärkere Zurückhaltung der DNA auf den Filtern deutet auf Vernetzungen hin, die, wenn sie durch Proteinspaltung mit Proteinase K verschwinden, als DNA-Protein-Vernetzungen

identifizierbar sind. Wenn Vernetzungen und Strangbrüche gleichzeitig vorliegen, werden die Strangbrüche erst sichtbar, wenn die DNA-Protein-Vernetzungen durch Behandlung mit Proteinase beseitigt werden.

Isolierte Thymuskerne wurden 15 Minuten mit 1 und 2 mM $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ und $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$ inkubiert und anschließend alkalisch eluiert. In der Abbildung 8 sind die Elutionsprofile dargestellt.

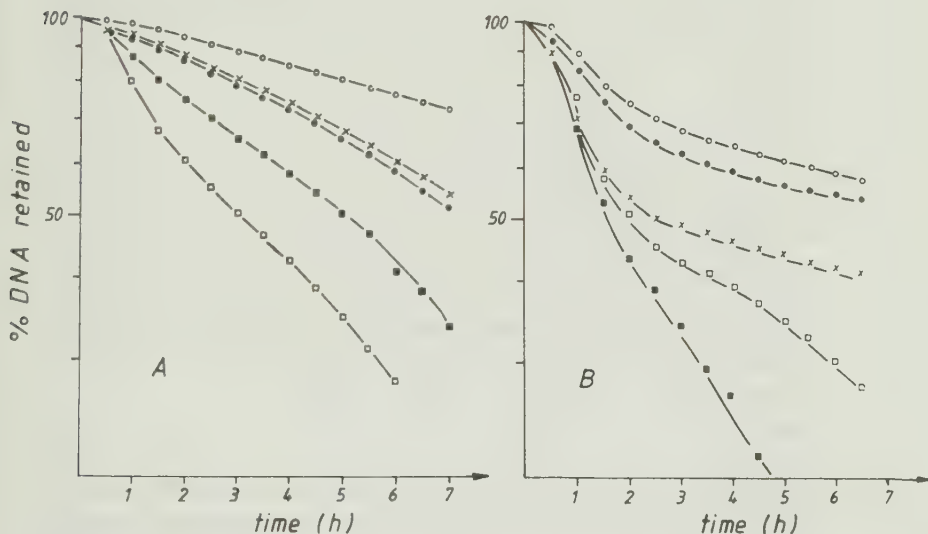


Abb. 8: Alkalische Elution Cr(III)-Komplex inkubierter Thymuszellkerne mit und ohne Proteinase K Behandlung.

(A) $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; (B) $\text{Cr}(\text{Gly})_3$

x Kontrolle ohne Chrom mit und ohne Proteinase

● 1,0 mM Cr ohne Proteinase

■ 1,0 mM Cr mit Proteinase

○ 2,0 mM Cr ohne Proteinase

□ 2,0 mM Cr mit Proteinase

Selbst bei der unbehandelten Kontrolle eluiert etwa 50% der gesamten DNA, so daß angenommen werden muß, daß die DNA der isolierten Thymuskerne bereits Brüche enthält, aber keine DNA-Proteinvernetzungen, weil sich der Kurvenverlauf der Kontrolle nach Proteinase Behandlung nicht ändert. Aber nach Inkubation mit den Chrom(III)-Komplexen

ist in beiden Fällen eine stärkere Zurückhaltung der DNA auf dem Filter zu beobachten, die durch Proteinase K aufgehoben wird. Proben mit Proteinasebehandlung zeigen eine stärkere DNA-Elution als die Kontrolle.

Leider erlaubt diese Methode ohne die Einführung eines internen Standards nur qualitative Aussagen (s.a. Kapitel 4.4.3.1). Weil nur maximal 8 Elutionskurven pro Versuch aufgenommen werden können, sind Doppelbestimmungen und die Darstellung der Schwankungsbreite nicht möglich. Die beobachteten Effekte konnten aber in weiteren Versuchen reproduziert werden, bei denen auch bezüglich der Vernetzungen und Brüche Dosisabhängigkeiten gefunden wurden.

Somit bestätigt die Untersuchung mit der Alkalischen Elution die Ergebnisse des einfachen Filterbindungstests. Die Inkubation isolierter Thymuskerne mit Chrom(III)-Komplexen produziert zwei Schadensmuster: DNA-Protein-Vernetzungen und Einzelstrangbrüche. Da sich zwischen den beiden untersuchten Chrom-Komplexen kein qualitativer Unterschied gezeigt hat, kann angenommen werden, daß die Ladung des Komplexes und die Art der Liganden für die Wirkung auf das Chromatin der Kerne keine Bedeutung hat.

Versuche mit Maus-Leukämie-Zellen (Fornace et al., 1981) ergaben bereits erste Hinweise auf die Chromatinvernetzenden Eigenschaften dreiwertigen Chroms bei isolierten Zellkernen, doch wurden dort keine Einzelstrangbrüche festgestellt. Eventuelle Unterschiede in der Kernpräparation könnten dafür verantwortlich sein. Untersuchungen der Reparaturaktivitäten in isolierten Kernen könnten klären, ob Reparaturprozesse zur Bildung von Strangbrüchen führen. Die Strangbrüche könnten aber auch während der Elution durch den alkalischen pH der Elutionslösung aus Alkalilabilen-Stellen entstehen. Wichtige Hinweise kann hier der Nick-Translations-Test liefern, mit dem Einzelstrangbrüche ohne den Einsatz alkalischer Lösungen festgestellt werden können.

4.2.2.3 Nick-Translations-Test

Im Nick-Translations-Test werden für den qualitativen Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen die Eigenschaften der DNA Polymerase I aus *E. coli* benutzt. Als Substrat dient der DNA Doppelstrang mit Strangbrüchen mit freien 3'OH-Enden, an die neue Nukleotide synthetisiert werden, wo vorher die Exonuclease-Aktivität der DNA Polymerase die Hydrolyse der vorhandenen Nukleotide katalysiert hat. Auf diese Weise wird der Strangbruch auf der DNA in 3'-Richtung verschoben (translatiert). Radioaktiv markierte Nukleotide werden in die neu synthetisierten Abschnitte eingebaut und können durch Säurefällung leicht von den freien Nukleotiden getrennt werden. Die Erhöhung der säurefällbaren Radioaktivität gegenüber der Kontrolle dient als Maß für die Zunahme an nicks. In der Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Versuche mit isolierten Kalbsthymuskernen dargestellt. Die Kerne werden unbehandelt verwendet, 10 Minuten bei 100°C aktiviert oder 30 Minuten mit Chromlösungen vorinkubiert. Als Chromlösung wird die instabile fünfwertige Chromverbindung $\text{Na}_4(\text{GSH})_4\text{Cr(V)} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$

Tab. 2: Nick-Translations-Test. Erhöhung der säurefällbaren Radioaktivität durch Hitzeschädigung und Chrominkubation. Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen mit jeweils Doppelbestimmung.

Probe	Polymerase	% Einbau der eingesetzten Radioaktivität
A Kontrollkerne	+	12,8
B hitzegeschädigte Kerne	+	48,9
C Kerne	-	1,4
D 45 Min. Cr(III)-Inkubation	+	19,1
E 45 Min. Cr(III)-Inkubation	-	0,9
F 45 Min. Cr(V)-Inkubation	+	26,0

verwendet. Diese wird sofort nach dem Lösen eingesetzt, weil sie in wenigen Minuten zu Chrom(III) weiterreagiert. Als dreiwertiges Chrom wird das Endprodukt dieser Reaktion (24 Stunden nach dem Lösen liegt nur noch Chrom(III) vor) eingesetzt. Beide Lösungen enthalten 2 mM Chrom. Die Tabelle 3 zeigt, daß die DNA unbehandelter Kerne bereits einige Nicks enthält, denn fast 13% der angebotenen Radioaktivität wird in die DNA eingebaut, während im Ansatz C ohne Polymerase nur 1,4% gefällt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Ergebnis der Alkalischen Elution, wo die DNA aus unbehandelten Thymuskernen bereits stark eluierte.

Eine Aktivierung durch Hitze bewirkt eine Erhöhung der säurefällbaren Radioaktivität auf nahezu 50%. Auch die Inkubation mit 2 mM Chrom(V)- und Chrom(III)-Verbindungen führte zu einer Erhöhung gegenüber der Kontrolle auf 26,0 bzw. 19,1%. Daraus kann geschlossen werden, daß die Inkubation mit fünf- und dreiwertigen Chrom-Komplexen die Bildung von zusätzlichen Einzelstrangbrüchen induziert. Die geringe Radioaktivität von 0,9% im Inkubationsansatz E ohne Polymerase beweist, daß es sich hierbei nicht um eine unspezifische Bindung der radioaktiven Nukleotide mittels des dreiwertigen Chroms handelt, wie sie beim Nick Translations Test mit isolierter DNA beobachtet wurde (Nishio und Uyeki, 1985).

Entsprechend der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit alkalischer Elution an isolierten Thymuskernen kann auch im Nick-Translations-Test die Induktion von Strangbrüchen durch drei- und fünfwertiges Chrom gezeigt werden. Die fünfwertige Verbindung ist unter den gewählten Bedingungen effektiver.

4.3 Chromwirkung auf Säugetierzellen

4.3.1 Wachstums- und Inkubationsbedingungen der V79-Zellen

Die verwendeten V79-Zellen sind eine permanente Lungenfibroblasten-Zelllinie des chinesischen Zwerghamsters und wurden als Monolayer in Plastikkulturflaschen oder Schalen gezüchtet. Es wurde zunächst eine Wachstumskinetik aufgenommen. Außerdem wurden Zellen kryokonserviert, so daß immer wieder auf die Ausgangskultur zurückgegriffen werden konnte.

Die Verdopplungszeit liegt bei 10,8 Stunden. Da die V79-Zellen sofort nach Erreichen der Konfluenz beginnen, sich von der Unterlage abzulösen, wurden sie kurz vorher umgesetzt.

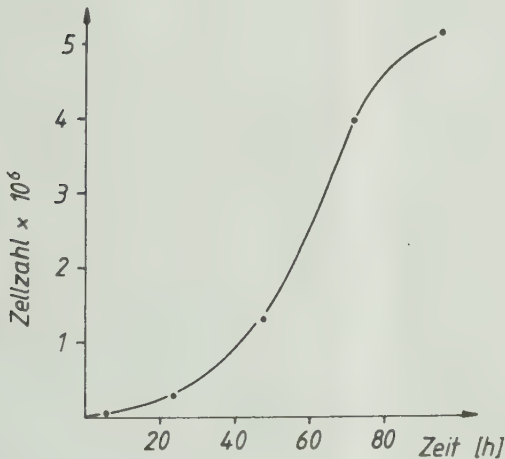


Abb. 9: Wachstumskurve von V79-Zellen in α -MEM mit 10% fötalem Kälberserum, 5% CO₂-Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit. Doppelbestimmung

Die Inkubation der V79-Zellen mit den Chromverbindungen erfolgte in komplettem Kulturmedium. Ein besonderer Fall der dreiwertigen Chromkomplexe ist $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$, der in neutral gepufferten Lösungen, also auch in Zellkulturmedium ausfällt, während die anderen benutzten Chromverbindungen in den verwendeten Konzentrationen im Kulturmedium löslich sind. In der Abbildung 10 sind Fotos von V79-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase in normaler Kulturmedium dargestellt (A). In (B) ist die Trübung des Mediums durch den ausgefallenen Chromkomplex sichtbar. Daraus resultiert keine Wachstumsbeeinflussung der V79-Zellen (s.a. Kap. 4.3.3).

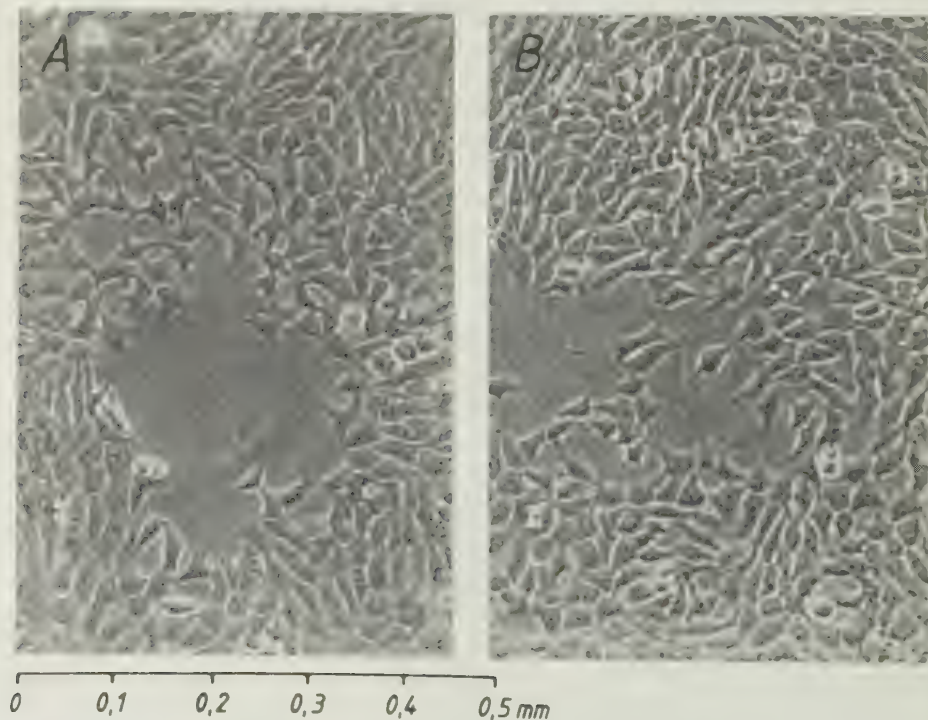


Abb. 10: V79-Zellen in logarithmischer Wachstumsphase ohne (A) und mit 3 mM $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ (B).

4.3.2 Aufnahme von Chromverbindungen in Hamsterzellen

4.3.2.1 Permeabilisierte Zellen

Untersuchungen mit Erythrocyten haben gezeigt, daß dreiwertige Chromverbindungen im Vergleich zu den sechswertigen nur schlecht von Zellen aufgenommen werden (Kortenkamp et al., 1987). Durch Permeabilisierung der Zellmembran sollte versucht werden, die Aufnahme dreiwertigen Chroms in die V79-Zellen zu erhöhen und daran anschließend mögliche genotoxische Effekte zu untersuchen. Wichtig ist dafür, daß die Permeabilisierung möglichst schonend und reversibel ist, damit ein großer Teil der Zellen lebensfähig bleibt.

Castellot et al. (1978) permeabilisierten BHK-Zellen für kleine Moleküle durch Inkubation in hypertonischem Medium und konnten sie durch Nachinkubation in normalem Wachstumsmedium wieder verschließen. Die erhöhte Membrandurchlässigkeit und deren Reversion kann mit Trypanblau gezeigt werden, das durch intakte Membranen zurückgehalten wird. Ob eine erhöhte Trypanblau-permeabilität auch ein Maß für eine erhöhte Durchlässigkeit der Membran für Chrom(III)-Komplexe ist, ist ungeklärt. Trypanblau ist zudem ein vierfach negativ geladenes Ion und unterscheidet sich hierin von den Chromverbindungen. Auch der Charakter der Permeabilisierung ist unbekannt.

Die V79-Zellen wurden 50 Minuten in hypertonischem Medium inkubiert. Die anschließende Färbung der Zellen mit Trypanblau zeigte, daß die Permeabilisierung eine Mischung von Zellen verschiedener Stadien produziert: Intakte Zellen, permeabilisierte und tote Zellen, die sich bereits von der Unterlage ablösen. Dennoch wurden V79-Zellen 50 Minuten mit und ohne verschiedene Konzentration von dreiwertigem Chrom in hypertonischem und isotonischem Medium inkubiert und die Chromgehalte pro Zelle mit Graphitrohr-Atomabsorption bestimmt. Für die Inkubation wurde $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$ gewählt, da es im Gegensatz zu $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ im Kulturmedium löslich ist und keine lipophilen Liganden enthält. Die Abbildung 11 zeigt die

Chromgehalte von V79-Zellen nach 50 Minuten Inkubation in hypertonischem und isotonischem Medium.

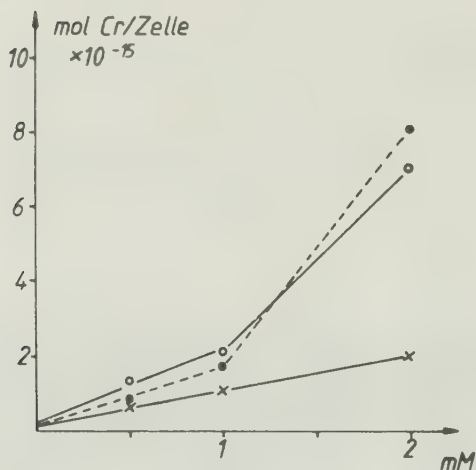


Abb. 11: Aufnahme von $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$ in permeabilisierte und nicht permeabilisierte CHO-Zellen. o und ● permeabilisiert, 2 unabhängige Versuche; x nicht permeabilisiert

Durch Permeabilisierung konnte lediglich bei der höchsten angebotenen Konzentration (2 mM) eine Vervierfachung der Chromaufnahme erreicht werden, bei den kleineren Konzentrationen war nur eine geringe Erhöhung festzustellen. Bei 1 mM Chrom-Angebot beträgt der Chromgehalt der V79-Zellen nach Inkubation mit $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$ nur etwa das Doppelte der nicht permeabilisierten. Negative Befunde bezüglich der cytotoxischen und genotoxischen Effekte bei permeabilisierten Zellen nach Inkubation mit 1 mM $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Bianchi et al., 1984) mögen daher auf die kaum erhöhte Aufnahme bei permeabilisierten Zellen zurückzuführen sein und klären noch nicht die Frage, ob dreiwertiges Chrom genotoxisch ist.

Die Permeabilisierung stellt für die mit hohen Chromkonzentrationen behandelten Zellen einen zusätzlichen

Streß dar. Deshalb wurde es vorgezogen, in weiteren Versuchen eine erhöhte Aufnahme von Chrom(III)-Komplexen durch Verlängerung der Inkubationszeiten in isotonischem Medium zu erreichen.

4.3.2.2 Chromaufnahme in Hamsterzellen und Effekt der Nachinkubation

V79- Zellen wurden jeweils 1 und 24 Stunden mit den Chrom(III)-Komplexen $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$, $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$ und $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$ inkubiert und die Chromaufnahme in die Zellen mit Graphitrohr-AAS bestimmt.

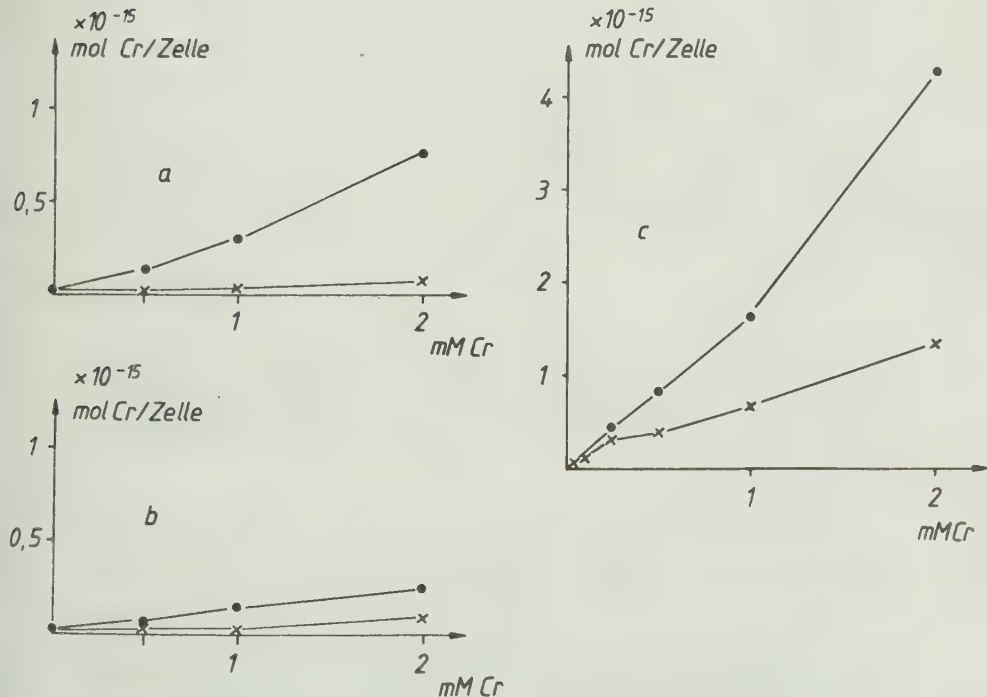


Abb. 12: Chromaufnahme nach 1 und 24 Stunden Inkubation der V79-Zellen mit verschiedenen dreiwertigen Chromkomplexen: a) $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$, b) $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$ und c) $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$. x 1 Stunde und • 24 Stunden Inkubation

Bei allen drei Chromkomplexen bringt eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 Stunden eine deutliche Erhöhung der Chromaufnahme. Der Vergleich der Chromkomplexe untereinander zeigt, daß der Chromglycinkomplex am schlechtesten aufgenommen wird, eine stärkere Aufnahme findet man bei cis-Chromphenanthrolin, die stärkste beim cis-Chrombipyridylkomplex, bei dem bis zu $4,4 \cdot 10^{-15}$ mol pro Zelle gemessen wurden. Bei 1 mM Konzentrationen und 24 Stunden Inkubation bei 37 °C in Zellkulturmedium sind Konzentrationen zwischen 0,15 und $1,8 \cdot 10^{-15}$ mol/Zelle nachweisbar. Nach nur 1 Stunde Inkubation liegt die gemessene Konzentration zwischen 0,03 und $0,7 \cdot 10^{-15}$ mol/Zelle (bei $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$ bzw. $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$).

Ein Vergleich der Aufnahme in Erythrocyten unter Einbeziehung des unterschiedlichen Zellvolumens (V79-Zellen sind etwa 40 mal größer als Erythrocyten) nach 1 stündiger Inkubation mit 1 mM Chrom(III)-Lösungen (Kortenkamp et al., 1987) zeigt, daß in V79-Zellen bei Komplexen mit lipophilen Liganden etwa genauso viel (o-Phenanthrolin: 1,5 fach höhere Konzentration bei V79-Zellen) oder viel mehr (Bipyridin: 10,8 fach höhere Konzentrationen) intrazelluläres Chrom vorliegt. Das Verhältnis kehrt sich um bei dem ungeladenen $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$, dort ist die Konzentration bei Erythrocyten 2,5 fach höher und sogar 8 fach höher ist sie nach Aufnahme von sechswertigem Chrom bei Erythrocyten, die auf den Transport von Anionen spezialisiert sind. Allerdings ist nach 1 stündiger Inkubation bei V79-Zellen im Gegensatz zu den Erythrocyten noch keine Sättigung der Aufnahme erreicht, wie die höheren Werte nach 24 Stunden Inkubation zeigen.

Eine 50 minütige Nachinkubation in Kulturmedium im Anschluß an die 50 Minuten Chrominkubation ergab, daß die Chromaufnahme teilweise reversibel ist: Ein großer Teil des aufgenommenen Chroms wird während der Nachinkubation wieder abgelöst; beim Chromglycinkomplex 3/4, beim Chromphenanthrolinkomplex 1/2 der gebundenen Menge nach Inkubation mit 2 mM Cr.

Daher erhebt sich die Frage, ob das gemessene Chrom überhaupt von den Zellen aufgenommen wird oder nur an der äußeren Membran haftet. Deshalb sollte die intrazelluläre Verteilung des Chroms nach Inkubation der intakten Zellen gemessen werden.

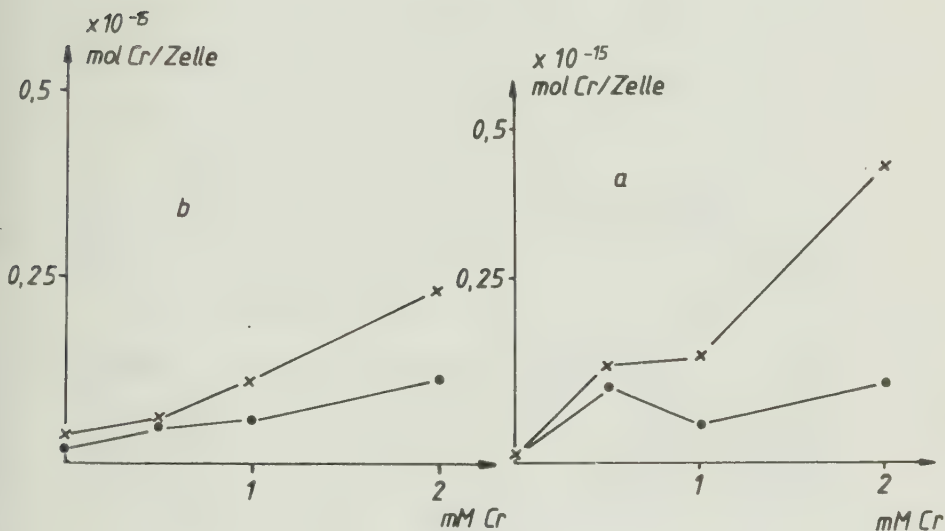


Abb. 13: Chromaufnahme in V79-Zellen bei x 50 Minuten Inkubation und • Effekt der Nachinkubation, a) $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$ und b) $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$

4.3.2.3 Chromaufnahme in die Zellen und Bindung an den Zellkern

Als Hinweis für die tatsächliche Aufnahme in die Zellen kann die Bindung des Chroms an den Zellkern dienen. Daher wurden aus den inkubierten Zellen die Zellkerne präpariert

und deren Chromgehalte sowie der der Zellen mit Graphitrohr-AAS gemessen.

Die V79-Zellen wurden 24 Stunden mit den Chromkomplexen inkubiert, außerdem zum Vergleich 6 Stunden mit sechswertigem Chrom. Anschließend wurden die Zellkerne präpariert und der Anteil des kerngebundenen Chrms vom Gesamtchrom der ganzen Zelle bestimmt.

Aus der Abbildung 14 ist ersichtlich, daß bei jedem der untersuchten Chromkomplexe, sowohl dem sechs- als auch den dreiwertigen, nach 24 stündiger Inkubation ein signifikanter Teil des aufgenommenen Chrms als am Kern gebunden vorliegt. In dieser Versuchsreihe ergab sich eine deutlich höhere Aufnahme vom Chromglycinkomplex im Vergleich zu den Aufnahmemessungen nach 1 und 24 Stunden Inkubation (Abb. 14). Möglicherweise ist dieser Unterschied darauf zurückzuführen, daß hier der Glycinkomplex nicht vollständig gelöst vorlag und somit ein weiterer Aufnahmeweg über Phagocytose möglich war.

Aus den steigenden Chromgehalten der Zellkerne läßt sich schließen, daß die Bindung des dreiwertigen Chrms nicht nur eine Bindung an die äußere Zellmembran, sondern eine Aufnahme in die Zelle mit intrazellulärer Verteilung ist. Die Menge des gesamten und auch des kerngebundenen Chrms steigt mit wachsendem Chromangebot. Dieses Ergebnis ist in Tabelle 4 dargestellt. Der Anteil des Chrms im Zellkern im Verhältnis zum an die gesamte Zelle gebundenen liegt bei 20%, mit einer Ausnahme: bei $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ ist er deutlich höher, etwa 50% ist bei allen angebotenen Konzentrationen kerngebunden.

Die signifikant stärkere Kernbindung nach Inkubation mit $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ kann an einer unterschiedlichen intrazellulären Verteilung der Chromkomplexe liegen, möglicherweise in Abhängigkeit von der Art der Liganden. Denkbar ist auch ein anderer Aufnahmeweg infolge der Unlöslichkeit dieses Komplexes im Zellkulturmedium. Auffällig ist, daß bei Chromat schon nach 0,15 mM Cr(VI)-Angebot das Plateau von ca. $6 \cdot 10^{-15}$ mol/Zelle bei der Gesamtkonzentration der Zelle erreicht ist, die Kernbindung aber einen linearen

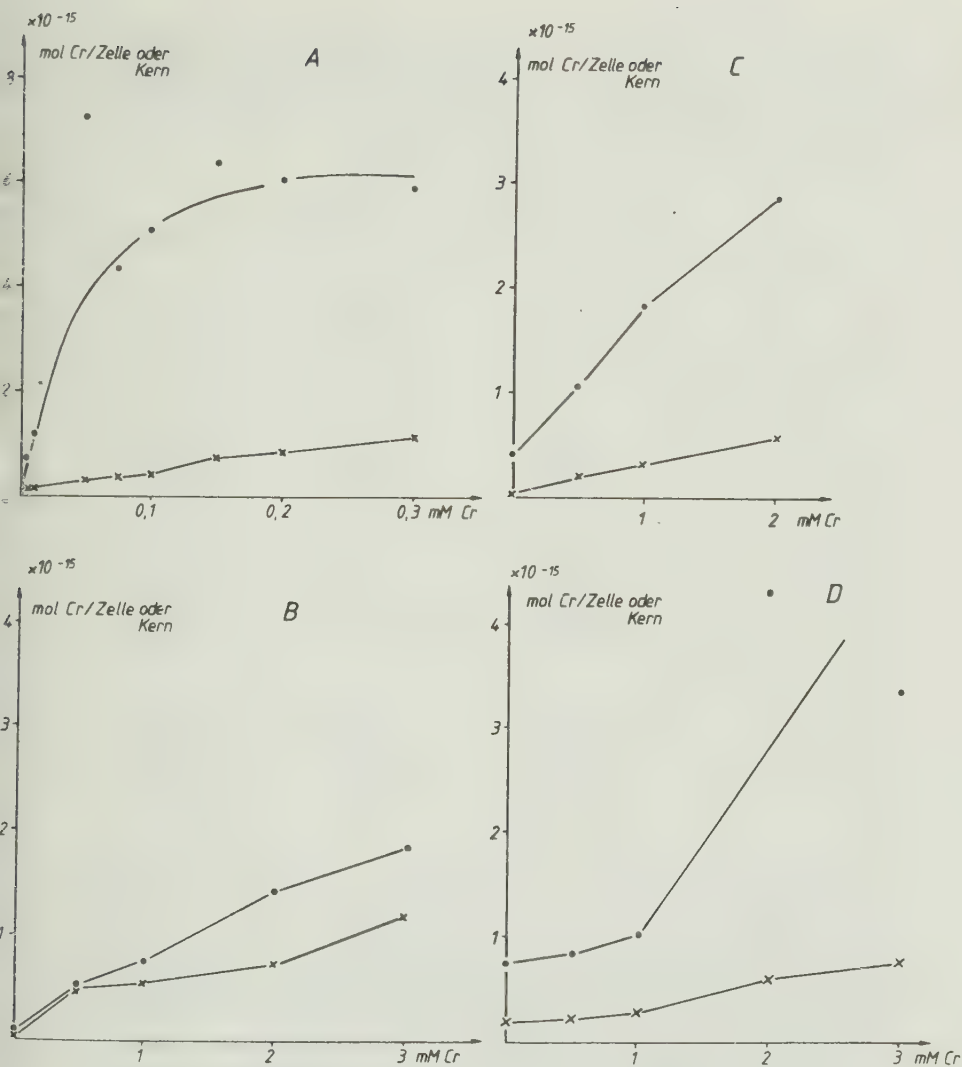


Abb. 14: Aufnahme von Chrom(III)-Komplexen in V79-Zellen nach 24 Stunden Inkubation und Chromgehalt der Zellkerne. •—• Zellen, x—x Kerne. (A): $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, (B): $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$, (C): $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$, (D): $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$

Tab. 4: Chrom-Aufnahme und Kernbindung bei V79-Zellen nach 24 Stunden Inkubation (6 Stunden Inkubation bei Chromat) mit verschiedenen Chrom-Verbindungen und prozentualer Anteil des kerngebundenen Chroms vom Gesamtchrom der Zelle. Durchschnittswerte aus Doppelbestimmungen.

mM	mol Cr/Zelle · 10 ⁻¹⁵	mol Cr/Kern · 10 ⁻¹⁵	% Kernbindung
<u>[Cr(H₂O)₄Cl₂]⁺</u>			
0	0,074	0,003	4
0,5	0,528	0,511	97
1,0	0,762	0,556	73
2,0	1,414	0,732	52
3,0	1,835	1,186	65
<u>[Cr(bipy)₂Cl₂]⁺</u>			
0	0,441	0,085	18
0,5	1,102	0,187	18
1,0	1,835	0,325	18
2,0	2,880	1,186	65
<u>[Cr(Gly)₃]⁰</u>			
0	0,745	0,202	27
0,5	0,858	0,217	25
1,0	1,024	0,287	28
2,0	4,300	0,737	22
<u>Cr(VI)</u>			
0	0,074	0,003	4
0,05	6,735	0,323	5
0,10	5,095	0,419	8
0,15	6,403	0,769	12
0,20	6,071	0,881	15
0,3	5,978	1,182	20

Anstieg bis zur höchsten gemessenen Konzentration zeigt. Hier scheint die Kinetik der intrazellulären Verteilung unabhängig von der schnellen Aufnahme in die Zellen zu sein, während bei den dreiwertigen Chromverbindungen die Aufnahmerate auch die intrazelluläre Verteilung bestimmt. Ein Vergleich der Chromgehalte der Zellkerne nach Inkubation mit [Cr(H₂O)₄Cl₂]⁺ mit den Bindungsstudien an isolierten Thymuskernen (Kapitel 4.2.1) zeigt, daß die isolierten Kerne bei 1 Stunde Inkubation mit 1 mM Chrom(III) etwa 2 · 10⁻¹⁵ mol Chrom pro Kern gebunden haben und ganze Zellen nach 24 Stunden Inkubation etwa 0,5 · 10⁻¹⁵ mol Chrom pro Kern, also etwa 4 mal mehr. Chromat bindet nicht an

isolierte Thymuskerne, aber nach Inkubation ganzer Zellen liegt ein Teil des aufgenommen Chroms an den Kern gebunden vor.

4.3.3 Cytotoxizität der Chromverbindungen

Zur Bestimmung der Cytotoxizität wurden verschiedene Tests benutzt, die eine unterschiedliche Aussagekraft haben. Die akute Toxizität, d.h. die Messung der Zellzahl (direkt nach der Inkubation der Zellen mit dem Schadstoff) gibt Aufschluß über das durch die Inkubation hervorgerufene Ablösen der Zellen von der Unterlage. Die abgelösten Zellen sind dann nicht mehr teilungsfähig und werden während des Waschens entfernt. Der Test auf akute Toxizität sagt aber noch nichts über die Lebensfähigkeit der noch angehefteten Zellen aus. Diese kann aus der Fähigkeit der Zellen zur Koloniebildung exakt ermittelt werden, indem die inkubierten Zellen dünn ausgesät und die entstehenden Kolonien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gezählt werden. Der Kolonieüberlebens-test, der in dieser Arbeit auch durchgeführt wurde, hat schwächere Aussagekraft, da die Aussaat vor der Inkubation stattfindet und zum Zeitpunkt der Inkubation pro Kolonie bereits zwei Zellen vorliegen, die beide sterben müssen, damit keine Kolonie gebildet wird. Beim chronischen Inkubationstest werden die Zellen dünn ausgesät und gleichzeitig bis zur Koloniezählung mit dem Schadstoff inkubiert. Somit sind während der Inkubation die Zellen noch nicht angeheftet und in relativ geringer Dichte vorhanden; aus jeder einzelnen Zelle, die sich anheftet und überlebt, entsteht auch tatsächlich eine Kolonie.

Die Ergebnisse aus den verschiedenen Tests für die Chromkomplexe unterscheiden sich nicht in ihrer qualitativen Aussage: Die Komplexe mit den lipophilen Liganden

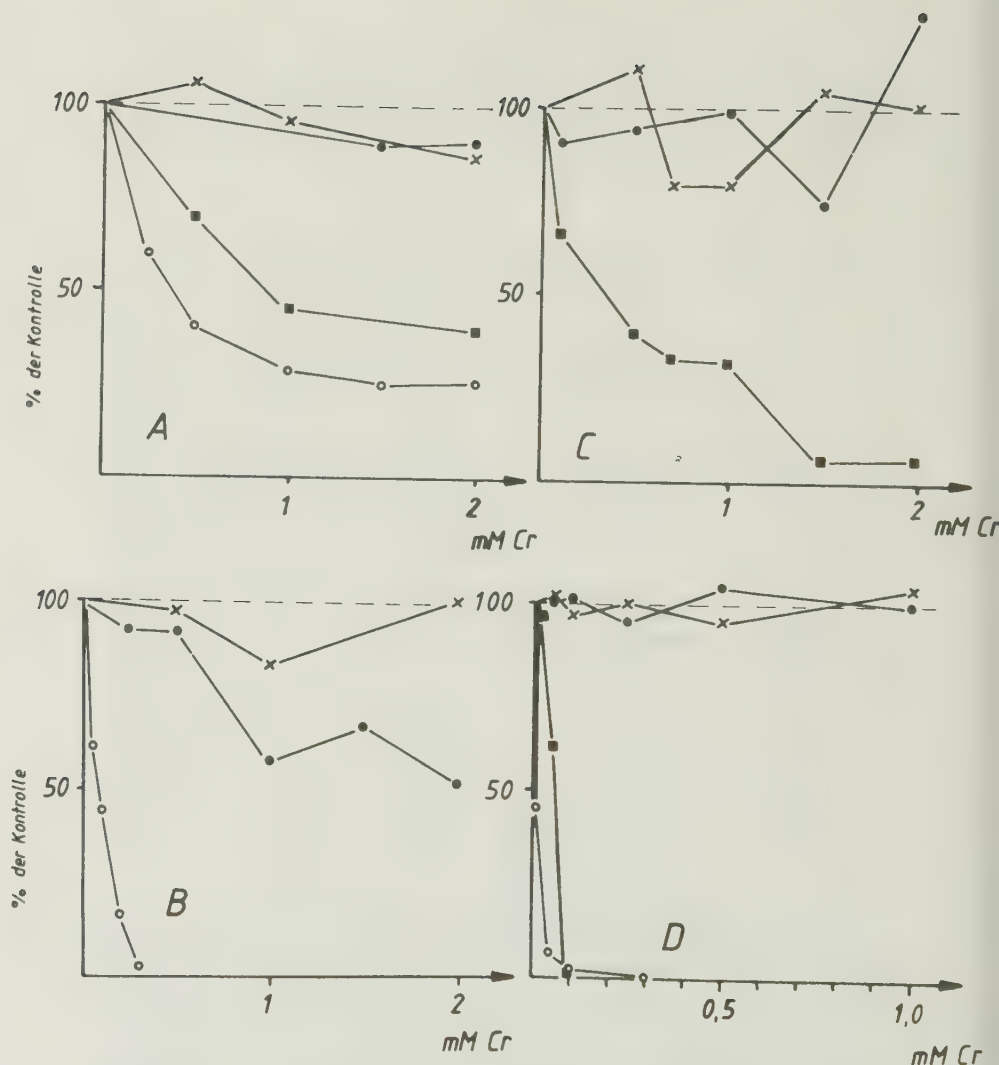


Abb. 15: Cytotoxizität der Chrom(III)-Komplexe in verschiedenen Tests. A: Akute Toxizität von Chromverbindungen nach 24 Stunden Inkubation, B: Cytotoxizität von Chromverbindungen im Koloniebildungsfähigkeitstest, C: Cytotoxizität von Chromverbindungen im Kolonieüberlebenstest, D: Cytotoxizität von Chromverbindungen bei chronischer Inkubation. Jeweils Doppelbestimmung.

x [Cr(Gly)₃]⁰, ■ [Cr(phen)₂Cl₂]⁺, ● [Cr(H₂O)₄Cl₂]⁺ und ○ [Cr(bipy)₂Cl₂]⁺

sind stark cytotoxisch, der Chromglycin- und der Chromwasserkomplex dagegen beeinflussen das Zellwachstum bis zu hohen Konzentrationen von 2 mM nicht. Im Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Tests kommt deren oben beschriebene unterschiedliche Empfindlichkeit zum Ausdruck: Im Kolonieüberlebenstest sind z.B. höhere Konzentrationen von Chromphenanthrolinkomplex nötig, um 50% der Kolonien zu verhindern (ca. 0.25 mM) als beim chronischen Inkubationstest (0.05 mM), der am empfindlichsten ist.

Der Test auf akute Toxizität zeigt nicht die Auswirkung auf die Teilungsfähigkeit der Zellen. Im Mutations-Test war sogar noch nach der 6 tägigen Expressionsphase eine andauernde Verlangsamung des Zellwachstums der überlebenden Zellen nach Inkubation mit den cytotoxischen Komplexen zu beobachten. Dieser Effekt war auch an der Koloniegröße im Vergleich zur Kontrolle feststellbar.

Daß das Chromtrichlorid die Fähigkeit zur Koloniebildung hemmt, in den anderen Tests aber keine Effekte zeigt, läßt sich darauf zurückführen, daß die Zellen durch den ausgefallenen Komplex miteinander verklumpt waren und daher nicht jede Zelle die Möglichkeit hatte, eine einzelne Kolonie zu bilden. Dieses Problem trat in den anderen Tests nicht auf, da die Zellen vor bzw. gleichzeitig mit der Inkubation ausgesät wurden.

4.3.4 Alkalische Elution der Hamsterzellen

4.3.4.1 Einführung von Einzelstrangbrüchen mit Röntgenstrahlung

Die Methode der Alkalischen Elution der DNA vom Filter ist relativ störanfällig. Durch Scherkräfte von Luftblasen unterhalb des Filters oder durch strangbrechendes Licht kön-

nen zusätzliche Schäden entstehen. Die Einführung eines internen Standards kann die Schwankungen innerhalb eines Versuchs sichtbar machen und die DNA-Veränderungen können quantifiziert werden. Als interner Standard dient die Zugabe von röntgenbestrahlten Zellen auf jedes Filter. Durch die Markierung mit einem anderen Isotop sind sie von den zu untersuchenden Zellen unterscheidbar.

Mit Hilfe von Röntgenstrahlung werden statistisch verteilte Einzelstrangbrüche in die DNA der Zellen eingeführt. Diese Strangbrüche führen in der halblogarithmischen Auftragung der Elutionskurven zu Geraden, da die Kinetik der Elution von der Stranglänge abhängt. Aus dem Vergleich der chemikalienbehandelten Proben mit den bestrahlten läßt sich die Bruchfrequenz in rad-Äquivalent angeben. Erst über eine Eichung mit Sedimentationsanalysen kann für die verwendete Zellsorte die Angabe von rad-Äquivalent in Strangbrüche pro Molekül angegeben werden (Kohn et al., 1976; Kohn, 1979; Kohn et al., 1981). Ein gray entspricht 100 rad.

Die nächstgelegene Strahlenquelle mit ausreichender Energie, so daß die Strahlendosis in vertretbarer Zeit erreicht werden kann, befindet sich außerhalb der Universität im Zentralkrankenhaus St.-Jürgen-Str. Die zu bestrahlenden Zellen wurden in fest verschließbaren Kulturflaschen gezüchtet und ihre DNA radioaktiv markiert. Die Zellen wurden im Eisbad zur Strahlenquelle transportiert. Die Abbildung 16 zeigt ein typisches Elutionsprofil nach Bestrahlung mit 0, 1, 5 und 10 gray. Mit steigender Strahlendosis nimmt auch der Anteil eluierter DNA zu.

^{14}C -markierte V79-Zellen, die mit 5 gray bestrahlt wurden, dienten als interner Standard. Nach 8 Stunden Elution ist bei 5 verschiedenen Filtern $46,5 \pm 2,6\%$ der DNA auf den Filtern zurückgehalten. Der Kurvenverlauf entspricht der in Abb. 16 dargestellten Kurve der ^3H -markierten Zellen, die ebenfalls mit 5 gray bestrahlt wurden.

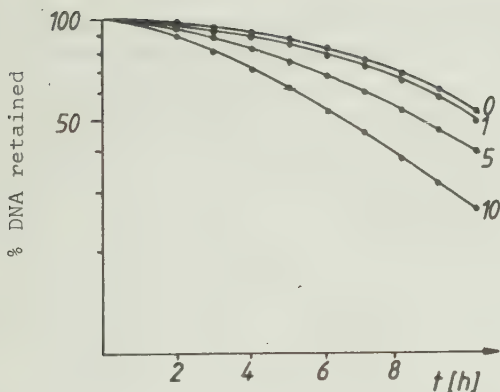


Abb. 16: Elution von Tritium-markierten V79-Zellen nach Röntgenbestrahlung, pH-Wert der Elutionslösung war 12,2; Strahlendosis in gray.

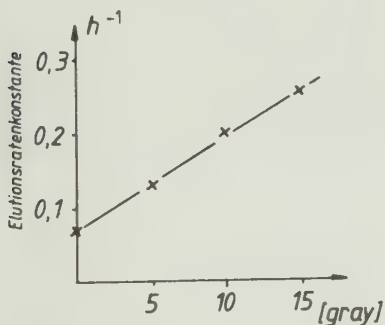


Abb. 17: Abhängigkeit der Elutionsratenkonstante bei V79-Zellen von der Strahlendosis

An die Elutionskurven der V79-Zellen können in der halblogarithmischen Auftragung Geraden angelegt werden. Die Steigung dieser Geraden ist die Elutionsratenkonstante, die gegen die Strahlendosis aufgetragen wird. Daraus ergibt sich eine lineare Beziehung, wie in Abbildung 17 zu sehen ist.

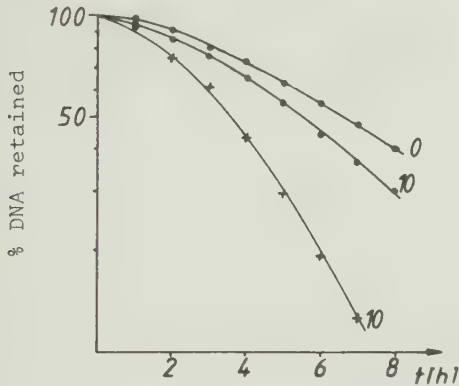
Die Größenordnung der in diesen Versuchen ermittelten Konstanten stimmt mit den Literaturwerten überein (Kohn et al. 1981), obwohl für die V79-Zellen höhere Strahlendosen verwendet werden mußten. Bei L1210 Zellen erhielten Kohn et al. (1981) mit 6 Gray eine Konstante von ca. $0,3 \text{ h}^{-1}$, wofür bei den V79-Zellen 15 gray eingesetzt werden mußten. Auch in anderen Labors waren V79-Zellen unempfindlicher für röntgeninduzierte Strangbrüche (Blakely et al., 1982). Ein methodisches Problem der Versuche dieser Arbeit ist die Notwendigkeit des Transportes von der Strahlenquelle zum Ort der Alkalischen Elution, der mindestens 45 Minuten dauerte. Zwar wurden die Zellen im Eisbad und unter Lichtausschluß transportiert, aber der Verlauf der Kontrollkurven deutet an, daß sie trotzdem einerseits zusätzliche Schäden davortragen und andererseits ein Teil der strahleninduzierten Schäden wieder repariert wird. Denn die Reparatur von Strangbrüchen erfolgt innerhalb von Minuten: Nach Bestrahlung mit 800 rad sind die Einzelstrangbrüche bei V79-Zellen bereits nach 5 Minuten bei 37°C zu 50% repariert (Bradley und Erickson, 1981). Wegen der genannten methodischen Probleme wurde in den weiteren Untersuchungen zur Wirkung der Chromverbindungen auf die Röntgenbestrahlung und die Einführung eines internen Standards verzichtet.

4.3.4.2 Einfluß des pH-Wertes der Elutionslösung

Zur Untersuchung des Einflusses des pH Wertes auf die Elution wurden V79-Zellen mit 10 gray bestrahlt und mit Elutionslösungen mit den pH-Werten 12,1 und 12,5 eluiert. Als Vergleich wurde eine unbestrahlte Kontrolle bei 12,1 eluiert.

Die Abbildung Nr. 18 zeigt, daß eine Erhöhung des pH-Wertes von 12,1 auf 12,5 eine stärkere Elution der DNA bestrahlter Zellen bewirkt. Auch bei Kohn et al. (1981) ist dieser Einfluß beschrieben.

Abb. 18: Elution von V79 Zellen bei pH-Wert • 12,1 und + 12,5 nach Röntgenbestrahlung.



Die genaue Kontrolle des pH-Wertes ist besonders wichtig, da bei verschiedenen pH-Werten unterschiedliche Schäden sichtbar sind. Unterhalb von pH 12,1 zeigt eine schnellere Elution das Vorliegen von Doppelstrangbrüchen. Ab pH 12,1 geht die DNA in die einzelsträngige Form über und Einzelstrangbrüche werden sichtbar und ab pH 12,5 werden die alkali-labilen Stellen in Einzelstrangbrüche umgewandelt und sind somit nachweisbar. Neben den Einzelstrangbrüchen und DNA-Protein-Vernetzungen wurden aufgrund der pH-Abhängigkeit und dem Verlust der Linearität der Elutionskurven bei CHO-Zellen auch die Induktion von alkali-labilen Stellen durch CaCrO_4 entdeckt (Cantoni und Costa, 1984).

4.3.4.3 Alkalische Elution von V79-Zellen nach Inkubation mit Chromverbindungen

Mit der Alkalischen Elution sollte untersucht werden, ob außer Chromat auch dreiwertige Chrom-Komplexe DNA-Schäden induzieren. V79-Zellen wurden daher 24 Stunden mit den Chrom(III)-Komplexen mit den Liganden o-Phenanthrolin, Bipyridin und Wasser bzw. 5 Stunden mit Chromat inkubiert und anschließend alkalisch eluiert.

Die Elution wurde durch Chromat beeinflusst; die DNA inkubierter Zellen wurde auf dem Filter stärker zurückgehalten als die Kontroll-DNA, was auf Vernetzungen hindeutet. Bei Einsatz von Proteinase K eluierte die DNA dann schneller als die Kontroll-DNA. Die Vernetzungen waren demnach DNA-Protein-Vernetzungen, deren Beseitigung den zweiten durch Chromat produzierten Schaden sichtbar werden ließ, die DNA-Strangbrüche.

Aber bei keinem der dreiwertigen Chromkomplexe wurden bei Konzentrationen bis zu 2 mM Effekte auf das Elutionsverhalten festgestellt.

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu meinen Befunden bei isolierten Thymuskernen. Ein Grund kann sein, daß eine Aufnahme und Bindung an die Kerne bei ganzen Zellen allein nicht für die Produktion von DNA-Schäden ausreicht; denn der Unterschied im Chromgehalt pro Kern zwischen isolierten Thymuskernen und den Kernen, die aus den inkubierten V79-Zellen isoliert worden sind, ist nicht sehr groß: isolierte Thymuskern haben nur etwa 4 mal mehr Chrom gebunden.

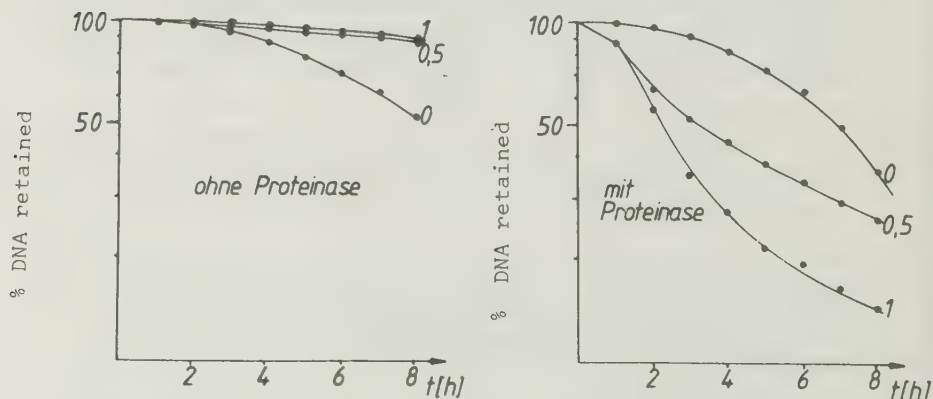


Abb. 19: Alkalische Elution von V79-Zellen nach 5 Stunden Inkubation mit 0, 0.5 und 1 mM Chromat ohne und mit Proteinase K.

4.3.5 Mutagenität von Chromverbindungen

Neben der Untersuchung auf chrominduzierte DNA-Schäden sollte bei Säugetierzellen auch deren Mutagenität getestet werden. Für Chromat ist die mutagene Wirkung sowohl bei Bakterien als auch bei Säugetierzellen bekannt (Bianchi et al., 1983; Newbold et al., 1979). Bei dreiwertigen Chromkomplexen konnten in Bakterien Erhöhungen der Mutationsraten erzielt werden, wenn das Chrom mit lipophilen Liganden komplexiert ist (Beyersmann et al., 1984). Die Ergebnisse aus dem Ames-Test sind nicht auf Säugetierzellen übertragbar. Bakterienzellen unterscheiden sich hinsichtlich Membran-Aufbau und Aufnahmewegen sowie der Zugänglichkeit der DNA und Reparaturmechanismen erheblich von Säugerzellen, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Ames-Test auf höhere Organismen einschränkt. Die Mutagenität dreiwertiger Chromverbindungen, insbesondere mit lipophilen Liganden sollte daher in Säugetierzellen untersucht werden.

Der Mutationstest wurde mit V79-Zellen nach Hsie et al. (1979) durchgeführt. Getestet wurden die dreiwertigen Chromverbindungen $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$ und $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$ sowie Chromat.

Als Positivkontrolle wurde jeweils eine Kulturschale mit 5 J/m² UV-Licht bestrahlt. Zur Kontrolle der Spontanmutanten wurden unbehandelte Zellen verwendet. Die Testbedingungen wurden so gewählt, daß die Anzahl der Spontanmutanten möglichst gering war (< 10⁻⁵ Mutanten/Zelle); dabei zeigte sich, daß z.B. das fötale Kälberserum nicht nur von der gleichen Firma, sondern auch von der gleichen Charge stammen sollte, damit reproduzierbar gearbeitet werden kann. Die Zellen wurden 24 Stunden mit den dreiwertigen bzw. 5 Stunden mit den sechswertigen Chromverbindungen inkubiert und die Positivkontrolle mit UV bestrahlt. Die Cytotoxizität wurde mit dem Koloniebildungstest bestimmt (vergl. 4.3.3), welcher auch nach Ablauf der Expressionsphase zur Messung der lebensfähigen Zellen benutzt wurde. So können

die Mutanten pro 10^6 lebensfähigen Zellen errechnet werden. In den folgenden Abbildungen sind die Erhöhungen über die Spontanmutationsraten angegeben.

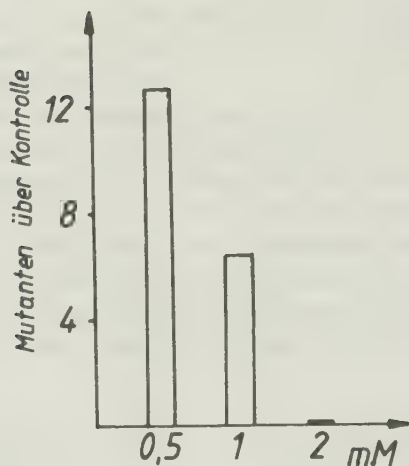


Abb. 20: Mutagenität von $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$, 24 Stunden Inkubation. Doppelbestimmung

Der Komplex des dreiwertigen Chrms mit Phenanthrolin ist deutlich mutagen, bei der kleinsten getesteten Konzentration wurde die Spontanmutationsrate um den Faktor 13 erhöht, bei 1 mM um 7. Die Abnahme der Mutagenität bei steigenden Konzentrationen ist auf eine Zunahme der Cytotoxizität zurückzuführen (vergl. 4.3.3).

Der Chrom-Bipyridylkomplex ist ebenfalls mutagen, er zeigte von allen getesteten Chromkomplexen die stärkste Mutagenität: Bei 0,2 mM erzielte er eine 23 fache Erhöhung

der Spontanmutationsrate. Auch hier zeigt sich der Effekt der Cytotoxizität, denn bei 0,3 mM wurde nur noch eine 18 fache Erhöhung gefunden.

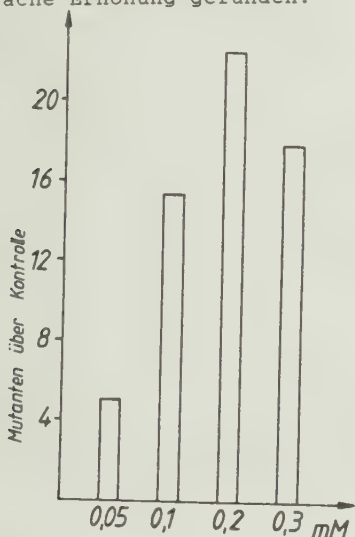


Abb. 21: Mutagenität von $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$ nach 24 Stunden Inkubation. Doppelbestimmung

Auch bei $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ wurde eine Erhöhung der Mutationsrate gefunden, die jedoch deutlich schwächer war als bei den Chromkomplexen mit lipophilen Liganden. Dieser Komplex liegt bei pH-Werten um den Neutralpunkt als unlöslicher mehrkerniger Hydroxokomplex vor und haftet als weißer Niederschlag an den Zellen, der auch durch Waschen nach der Inkubation nicht zu entfernen ist (vergl. Abb. 10). Der mutagene Effekt von $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ war reproduzierbar; die Abbildung 22 zeigt das Ergebnis zweier unabhängig durchgeführter Versuche.

Im Gegensatz zu $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$ und $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$ war $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$ unter den gleichen Bedingungen nicht mutagen.

Zum Vergleich wurde das als mutagen bekannte Chromat untersucht. Im Mutationstest mit Säugetierzellen, der für Metallverbindungen vergleichsweise unempfindlich ist, ruft Chromat relativ schwache Effekte hervor.

Dagegen konnte mit UV-Bestrahlung (5 J/m^2) Mutationsraten von 20 über der Spontanmutationsrate erreicht werden.

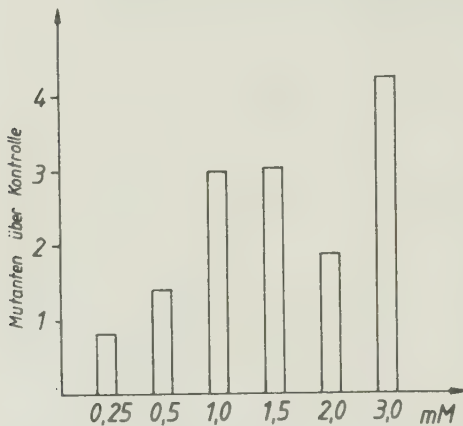


Abb. 22: Mutagenität von $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$. Die Werte von 0,5 bis 2 mM sind Mittelwerte aus 2 unabhängige Versuchen.

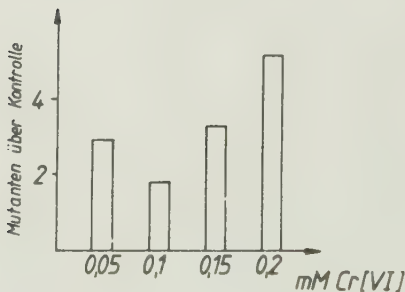


Abb. 23: Mutagenität von $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß drei von vier getesteten dreiwertigen Chromkomplexen mutagene Effekte zeigten, wobei die Komplexe mit den lipophilen Liganden o-Phenanthrolin und Bipyridin die stärkste Wirkung hatten, der ungeladene Chrom-Glycinkomplex war nicht mutagen. Auch das als nicht mutagen eingestufte Chromtrichlorid zeigte mutagene Wirkung.

5. Diskussion

Untersuchungen der Effekte von Chromverbindungen in gereinigten Nucleinsäure-Systemen, Bakterien und Hefen, Pflanzen- und Tierzellen in vivo und in vitro haben deren cytotoxische, cytogenetische und mutagene Aktivitäten gezeigt. Obwohl die verfügbaren Informationen ausreichen, die sechswertigen Chromverbindungen als genetisches Risiko für den Menschen einzustufen, gibt es noch Unsicherheiten beim Vergleich der Ergebnisse aus den vereinfachenden Kurzzeittests mit den in vivo Daten. Für die dreiwertigen Chromverbindungen sind die vorliegenden Ergebnisse manchmal widersprüchlich, aber meist negativ. Mit Hilfe der eigenen Versuchsergebnisse und anhand neuerer Literaturdaten möchte ich im folgenden ein Modell für die Wirkung von Chromverbindungen auf lebende Systeme entwerfen.

5.1 Chrom-Aufnahme

Die Aufnahme eines Stoffes in Zellen ist eine wichtige Voraussetzung für die Entfaltung seiner möglichen genotoxischen Wirkung.

Die mutagenen und carcinogen Eigenschaften sechswertiger Chromverbindungen sind seit Jahren bekannt, doch nach wie vor gibt es Unklarheiten über Unterschiede des carcinogenen Potentials von löslichen, schwach und nahezu unlöslichen Chromaten. Epidemiologische Untersuchungen in Verbindung mit neueren Ergebnissen aus Tierversuchen zeigen, daß die schwach löslichen Chromate das größte Potential haben, aber auch die löslichen Alkalichromate sind carcinogen (Steinhoff et al., 1986).

Gerade das carcinogene Potential der schwach löslichen Chromate und einige positive Befunde bei Kurzzeittests mit dreiwertigen Chromverbindungen lassen vermuten, daß die Löslichkeit eine große Bedeutung für die Entfaltung des carcinogenen Effekts hat. Schwach lösliche Verbindungen können durch Phagocytose in Zellen gelangen, liegen dann in relativ hoher Konzentration in den Zellen vor, werden

langsam gelöst und können dabei ihre Wirkung entfalten. Nahezu unlösliche Chromate könnten auch phagocytiert, aber nur schlecht in der Zelle solubilisiert werden. Bei gut löslichen Chromaten dürfte eine extrazelluläre Reduktion und Bindung an Makromoleküle die Aufnahme stark behindern. So ist erklärbar, daß die gleiche Wochendosis vom gut löslichen Natriumdichromat als Gesamtapplikation Tumore induziert, aber diesen Effekt nicht zeigt, wenn sie auf fünf einzelne Tage aufgeteilt wird (Steinhoff et al., 1986).

Nach Inhalation dreiwertiger Chromverbindungen sind keine Tumorinduktionen, aber Veränderungen bei Lungenmakrophagen von Kaninchen beobachtbar. Bei einer Applikation von $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, welches unter physiologischen Bedingungen unlöslich ist, tauchen Partikel in den Makrophagen auf. Doch die biologische Bedeutung dieser Veränderungen der Makrophagen ist noch unklar (Johansson et al., 1987).

Lösliche Chromate werden mittels eines Anionencarriers schnell in Säugetierzellen aufgenommen, intrazellulär reduziert und akkumuliert (Beyersmann et al., 1984). Schon wenige Stunden nach der Inkubation läßt sich das Chrom am Chromatin der Zellen nachweisen (Wedrychowski et al., 1985). Für Verbindungen des dreiwertigen Chrms gilt die Plasmamembran als weitgehend impermeabel. Jedoch deutet der Nachweis intrazellulär gebundenen Chrms in Leber und Nieren von Chrom-(III)-behandelten Versuchstieren (Cupo und Wetterhahn, 1985) darauf hin, daß zumindest im ganzen Organismus im Lauf der Zeit von Zellen resorbierbare Komplexe entstehen.

Die Aufnahme dreiwertiger Chromverbindungen in Säugetierzellen in Kultur ist bislang noch nicht untersucht worden. Meine Messungen haben ergeben, daß V79-Zellen während der Inkubation mit den Komplexen $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]$, $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$ und $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ Chrom aufnehmen. Der Vergleich der Aufnahme der dreiwertigen Chromkomplexe untereinander zeigte, daß der gelöste Chrom-Glycin-Komplex am schlechtesten aufgenommen wird und am besten der Komplex mit Bipyridin. Ein großer Teil des

aufgenommen Chroms liegt dann an den Zellkern gebunden vor, wobei dieser Anteil nach Inkubation mit $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ mit 50% deutlich höher ist als bei den anderen Komplexen.

Auch Erythrocyten des Menschen nehmen bereits innerhalb einer einstündigen Inkubation signifikante Mengen dreiwertiger Chromverbindungen auf (Kortenkamp et al., 1987). Doch bei V79-Zellen ist die Chrommenge bei gleicher Inkubationsdauer und gleichen Außenkonzentrationen ca. 1000-fach größer als bei den Erythrocyten, wenn nur die Angaben in mol/Zelle verglichen werden. Bezieht man beim Vergleich aber die unterschiedlichen Zellvolumina mit ein - die V79-Zellen haben ein etwa 40-fach größeres Zellvolumen und eine etwa 10-fach größere Oberfläche als die Erythrocyten - ist nur die intrazelluläre Chromkonzentration nach Inkubation mit Chromkomplexen mit den lipophilen Liganden in V79-Zellen wesentlich größer als bei den Erythrocyten. Bei Chromat zeigen die V79-Zellen im Vergleich mit den auf den Anionentransport spezialisierten Erythrocyten signifikant höhere Konzentrationen.

Allerdings ist nach einstündiger Inkubation noch keine Sättigung der Aufnahme von dreiwertigen Chromverbindungen erreicht, wie die höheren Chromgehalte nach 24 Stunden Inkubation der V79-Zellen zeigen. Bei längeren Inkubationszeiten könnten sich stärkere Unterschiede zeigen, weil V79-Zellen zusätzliche Wege der Aufnahme aufweisen, die den Erythrocyten nicht zur Verfügung stehen, z.B. Endocytose. Die Beteiligung solcher Vorgänge an der Aufnahme von Metallionen ist erwiesen: Elias und Mitarbeiter (1986) konnten mit dem Elektronenmikroskop die Phagocytose unlöslicher Chromoxid-Partikel in V79-Zellen zeigen; Hartwig (1987) hat die Phagocytose unlöslicher Verbindungen von Nickel, Cobalt, Blei, Chrom und Mangan beschrieben. Durch Pinocytose könnten aber auch im Kulturmedium gelöste Metallverbindungen in das Zellinnere gelangen. In den Aufnahmestudien mit Erythrocyten stellte der Chrom-Komplex mit Cystein eine Ausnahme dar, da er nur an die Plasmamem-

bran gebunden, intrazellulär aber nicht nachzuweisen war (Kortenkamp et al., 1987).

Die verschiedenen möglichen Aufnahmewege für verschiedene Chromverbindungen sind in der Abbildung 24 dargestellt.

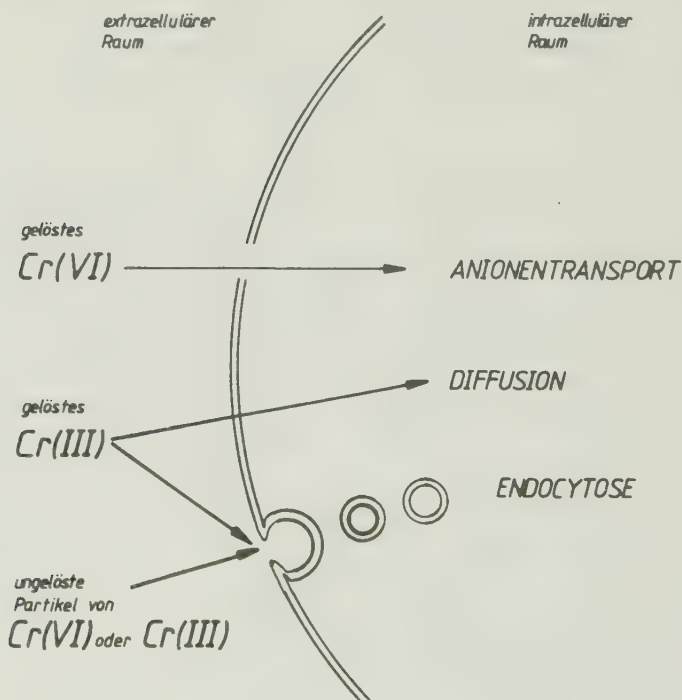


Abb. 24: Aufnahmewege für drei- und sechswertige Chromverbindungen in Säugetierzellen.

Die genannten Unterschiede zeigen, daß zum einen die Aufnahme und intrazelluläre Verteilung des Chroms von den Liganden beeinflusst wird und zum anderen Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen existieren.

Im Unterschied zum Chromat, dessen Aufnahme unidirektional verläuft (Beyersmann et al., 1984), scheint die Aufnahme

des dreiwertigen Chroms reversibel zu sein. In meinen Untersuchungen verringerte eine Nachinkubation der V79-Zellen in Zellkulturmedium den Chromgehalt pro Zelle. Diese Messungen lassen aber noch keine Aussagen darüber zu, ob nur das an die äußere Membran gebundene Chrom wieder entfernt wird oder aber das intrazelluläre Chrom wieder herausdiffundiert.

Zusammengefaßt kann gesagt werden, daß die untersuchten Säugetierzellen dreiwertiges Chrom aufnehmen, von dem ein Teil den Zellkern erreicht.

5.2. Genotoxische Wirkungen von Chromverbindungen

Die möglichen Wirkungen drei- und sechswertiger Chromverbindungen wurden auf unterschiedlichen Organisations-ebenen untersucht: in subzellulären Systemen wie isolierter DNA und isolierten Zellkernen sowie bei ganzen Zellen in Kultur.

5.2.1 Isolierte DNA

Verschiedene Chromverbindungen habe ich daraufhin untersucht, ob sie in der Lage sind, an isolierter superhelicaler Bakteriophagen-DNA Einzelstrangbrüche hervorzurufen. Alle eingesetzten dreiwertigen Verbindungen des Chroms und das Chromat zeigten unter den gewählten Bedingungen keine Effekte. $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ konnte nicht ausgewertet werden, da dieser Komplex wahrscheinlich aufgrund von Wechselwirkungen mit DNA eine Färbung der DNA-Banden der Elektrophorese-Gele mit Ethidiumbromid verhindert.

Eine Inkubation isolierter filtergebundener DNA aus V79-Zellen mit $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ und anschließende Untersuchung der DNA mit Alkalischer Elution brachte keine Veränderung gegenüber der Kontrolle, so daß angenommen werden kann, daß dreiwertiges Chrom bei isolierter DNA keine Strangbrüche hervorruft.

Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein: Weder sechs- noch dreiwertiges Chrom führt zu Strangbrüchen in isolierter DNA. Erst eine Kombination von Chromat mit Reduktionsmitteln, z.B. H_2O_2 , bewirkt Einzelstrangbrüche (Kawanishi et al., 1986). Die während dieser Chromatreduktion entstehende fünfwertige Zwischenstufe und die Bildung von Hydroxyl- und Sauerstoffradikalen wurde in der gleichen Arbeit durch geeignete Methoden (ESR und Einsatz von Radikalfängern) nachgewiesen. In Untersuchungen von Kortenkamp (1988) wurde superhelikale DNA mit Chromat und gleichzeitig mit dem Reduktionspartner Glutathion inkubiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen belegen, daß reaktive Zwischenprodukte wie Cr(V) direkt oder über Radikale an der Bildung der Strangbrüche beteiligt sind. Auch ein Komplex des fünfwertigen Chroms, $\text{Na}_4(\text{GSH})_4\text{Cr(V)} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, produzierte in dem Test mit isolierter superhelikaler DNA Strangbrüche.

Die Katalyse der DNA-Depurinierung durch Metallkationen könnte eine weitere Möglichkeit eines DNA schädigenden Mechanismus sein. Schaaper und Mitarbeiter (1987) zeigten die Depurinierung von isolierter DNA durch Kupfer- und Nickelionen bei 65°C und 24 Stunden Inkubation. Für dreiwertiges Chrom waren die Ergebnisse in diesem System unklar. Die Autoren berichten aber von einer Zerstörung der biologischen Aktivität isolierter Bakteriophagen-DNA durch mikromolare Mengen dreiwertigen Chroms, so daß die geschädigte DNA im Transfektionsexperiment nicht mehr aktiv ist. Zwar führt Chromtrichlorid selbst nicht zu Strangbrüchen in isolierter DNA, tritt aber mit ihr derart in Wechselwirkung, daß die DNA-Struktur destabilisiert wird (Tamino et al., 1981), die Stabilität der DNA gegenüber Säuredenaturierung zunimmt (Levis et al., 1978) und die DNA in eine sehr viel kompaktere Struktur kondensiert wird (Österberg et al., 1984).

5.2.2 Isolierte Zellkerne

Versuche mit isolierten Zellkernen bieten zwei Vorteile: Die Kerne enthalten einerseits das intakte Chromatin und ermöglichen andererseits die Untersuchung der Wirkung von Substanzen, die bei ganzen Zellen von der Zellmembran zurückgehalten werden, in der Zelle aber durchaus als Metaboliten entstehen und genotoxisch wirksam sein können.

Meine Versuche mit isolierten Zellkernen aus Kalbsthy-musgewebe haben ergeben, daß Chrom aus $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$, nicht aber aus Chromat an isolierte Zellkerne bindet. Die Komplexe des dreiwertigen Chrms $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ und $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$ führen zu Einzelstrangbrüchen und DNA-Protein-Vernetzungen, die mit Alkalischer Elution sichtbar gemacht wurden. Bei isolierten Kernen aus Mäuse L 1210 Leukämie-Zellen wurden mit Chromtrichlorid ebenfalls DNA-Protein-Vernetzungen gefunden, jedoch keine Einzelstrangbrüche (Fornace et al. 1981). Aufgrund der Ergebnisse mit isolierter DNA ist es unwahrscheinlich, daß dreiwertiges Chrom in den Thymuskernen direkt zu DNA-Strangbrüchen führt. Denkbar sind zwei Mechanismen, die sich gegenseitig nicht ausschließen: Chrom(III) führt über die Katalyse der Depurinierung zur Bildung alkali-labiler Stellen in der DNA, die während der Alkalischen Elution zu Einzelstrangbrüchen umgewandelt werden. Die Brüche könnten auch Ergebnis der Aktivität von Reparaturenzymen sein, die die alkali-labilen Stellen und/oder DNA-Protein-Vernetzungen beseitigen.

Die aus den Nick-Translations-Tests gewonnenen Ergebnisse unterstützen die Vermutung, daß dreiwertiges Chrom in isolierten Kernen zur Schädigung der DNA führt. Eine Erhöhung des Einbaus radioaktiv markierter Nucleotide in die DNA der Kerne ist ein deutlicher Hinweis auf die Existenz von Brüchen im Zucker-Phosphat-Gerüst (nicks) und zwar mit freien 3'-Enden. Diese Erhöhung wurde nach Inkubation mit $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ und noch stärker mit einer Verbindung des fünfwertigen Chrms, $\text{Na}_4(\text{GSH})_4\text{Cr}(\text{V}) \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, gefunden, die in wässriger Lösung allerdings in wenigen Minuten zum

dreiwertigen Chrom weiterreagiert. Das Vorliegen freier 3'-Enden in der DNA chrominkubierter Zellkerne spricht für die Wirkung von Reparaturenzymen. Diese Hypothese ließe sich zum Beispiel durch eine Hemmung der Reparaturprozesse während der Inkubation der Kerne überprüfen.

In isolierten Zellkernen aus Maus-Leukämie-Zellen konnten Fornace et al. (1981) nur mit Chromtrichlorid DNA-Protein-Vernetzungen induzieren, nicht mit Chromat, das aber eine schwache Bildung von Einzelstrangbrüchen bewirkte.

Meine Filterbindungsstudien deuten darauf hin, daß das Chrom selbst an den Vernetzungen beteiligt ist, da umso mehr Chrom auf den Filtern nachweisbar war, je mehr DNA dort zurückgehalten wurde. Die vernetzende Wirkung des dreiwertigen Chroms wird auch sichtbar, wenn isolierte DNA mit isoliertem Protein in Gegenwart von Chromtrichlorid inkubiert wird (Fornace et al., 1981).

5.2.3 Zellen in Kultur

Für die Untersuchung genotoxisch wirksamer Agentien sind Säugetierzellen in Kultur ein wichtiges Modellsystem. Denn mit vergleichsweise geringem zeitlichen und finanziellen Aufwand kann insbesondere die Aufnahme von Stoffen in Zellen, ihre Auswirkung auf deren Lebensfähigkeit, die Wechselwirkung mit dem genetischen Material und anderen Zellbestandteilen studiert werden. Die Grenze der Aussagefähigkeit von Experimenten mit Zellkultur ist dort erreicht, wo es um die Untersuchung der Beeinflussung der Zell-Regulation, z.B. durch Wechselwirkung mit Signal- und Botenstoffen, innerhalb der Gewebe oder Organe geht.

C y t o t o x i z i t ä t u n d M u t a g e n i t ä t
Cytotoxizität und Mutagenität sind zwei Effekte, die durch DNA-Schäden verursacht werden können, denn Fehler bei der Replikation können als Mutation an die nachfolgende Generation weitergegeben werden, sofern sie für die Zelle nicht letal sind.

Bei der Untersuchung der cytotoxischen Wirkung der eingesetzten Chromverbindungen hat sich gezeigt, daß die beiden Chromkomplexe mit den lipophilen Liganden Bipyridin und o-Phenanthrolin die Koloniebildung in mikromolaren Konzentrationen hemmten, das heißt in der gleichen Größenordnung wie Chromat. Dagegen hatten $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ und $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$ bis zu Konzentrationen von 2 mM keine cytotoxische Wirkung, obwohl auch bei ihnen eine Aufnahme in die Zellen gezeigt werden konnte. Daraus kann gefolgert werden, daß nicht allein die Aufnahme des Chrms in die Zelle, sondern auch die Art der chemischen Umgebung des Chrms innerhalb der Zelle für die toxischen Effekte von Bedeutung ist. Die Mutagenität des sechswertigen Chrms ist in Bakterien-, Hefe- und Säugetierzellen bereits untersucht worden. Chromat bewirkt im Ames-Test eine Erhöhung der Mutationsrate durch Basenpaarsubstitution und Frameshiftmutationen (Übersicht bei Bianchi und Levis, 1987). Die Mutationsrate wird durch den Zusatz von S9-Mix (Leber-Mikrosomen-Fraktion), der durch Chromatreduktion die Chrom-Aufnahme verringert, herabgesetzt. Es hat sich gezeigt, daß Komplexe des dreiwertigen Chrms mit lipophilen Liganden im Ames-Test mutagen sind (Warren et al., 1981a; Beyersmann et al., 1984). Auch sehr hohe Dosen von Chromtrichlorid erhöhten die Mutationsrate (Langerwerf et al., 1985). Die Mutagenität ist dabei nicht auf die Liganden zurückzuführen, denn die Liganden allein zeigten in Kontrollexperimenten keine mutagenen Effekte (Warren et al., 1981b). Die hohe Cytotoxizität von $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$ und $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$ korreliert nicht mit einer deutlich erhöhten Aufnahme im Vergleich zu den anderen beiden Chromkomplexen und beruht vielleicht nicht nur auf Wechselwirkung mit der DNA, sondern auf zusätzlichen Effekten, z.B. auf einer möglichen Schädigung der Zellmembran.

Bisherige Mutagenitäts-Untersuchungen dreiwertiger Chromkomplexe bei Säugetierzellen beschränkten sich auf den Vergleich mit Chromat. Daher wurden relativ geringe Konzentrationen und kurze Inkubationszeiten gewählt (Tindall und Hsie, 1980). Aufgrund der Aufnahmestudien

habe ich längere Inkubationszeiten für die Mutationstests gewählt. Die Untersuchung der Mutagenität erfolgte an dem HGPRT-Gen der V79-Zellen, das auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Die stärkste Erhöhung der Mutationsraten findet sich bei den Komplexen mit lipophilen Liganden, die auch am besten von den Zellen aufgenommen werden. Deren mutagener Effekt liegt im angewandten Test deutlich höher als der von Chromat. Der Komplex $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$, der in vielen Kurzzeittests als Repräsentant der dreiwertigen Chromverbindungen eingesetzt wird, ist im Mutationstest mit Säugetierzellen bislang noch nicht untersucht worden. Er führte zu einer schwachen, aber reproduzierbaren Erhöhung der Mutationsrate. Von den vier untersuchten dreiwertigen Chromkomplexen war allein $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]$ unter den gewählten Bedingungen nicht mutagen.

Die hier dargestellten Versuche zeigen, daß Komplexe des dreiwertigen Chroms auch bei Säugetierzellen cytotoxisch und mutagen wirken können. Die Art der Liganden hat für die unterschiedlichen Effekte große Bedeutung. Die genaue Struktur der Chromkomplexe nach ihrer Aufnahme in die Zellen ist noch unbekannt und kann unterschiedlich sein, je nach Art des außerhalb der Zelle vorliegenden Komplexes. In der Literatur wurden Unterschiede in der Geschwindigkeit des Ligandenaustausches diskutiert (Warren et al., 1981a), die in biologischen Systemen noch untersucht werden müssen.

S c h ä d i g u n g d e s C h r o m a t i n s

Chromate werden nach ihrer Aufnahme intrazellulär zu dreiwertigem Chrom reduziert. Da das sechswertige Chrom in subzellulären Systemen keine genotoxischen Effekte zeigt, wird vermutet, daß das dreiwertige Chrom in der Zelle die wirksame Form ist. Eine Inkubation von Säugetierzellen mit bestimmten Chrom(III)-Komplexen zeigt deren cytotoxische und mutagene Wirkung und unterstützt damit diese Vermutung.

Deshalb erscheint der Befund zunächst unverständlich, daß nach Inkubation mit den cytotoxischen und mutagenen

Chrom(III)-Komplexen bei V79-Zellen mit Alkalischer Elution keine DNA-Schäden feststellbar sind, wie sie an isolierten Zellkernen induziert werden. Selbst nach 24 Stunden Inkubation mit 10-fach höheren Konzentrationen als beim Mutationstest von $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$ entstehen weder DNA-Strangbrüche noch DNA-Protein-Vernetzungen. Auch $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$, von dem nach der Aufnahme ein großer Teil kerngebunden in der Zelle vorliegt, induziert bei intakten Zellen keine dieser Schäden. Nur mit Chromat können sie erzeugt werden. Dem entsprechen die Ergebnisse aus Tierversuchen: Nach Applikation dreiwertigen Chroms findet man in den Zellen Chrom, teilweise an den Zellkern gebunden, jedoch auch hier keine Induktion von DNA-Brüchen oder Vernetzungen (Cupo und Wetterhahn, 1985). Daraus kann geschlossen werden, daß für die Produktion dieser DNA-Schäden die Chrom-Bindung an das Chromatin nicht ausreicht. Vielmehr kann neben der Chrom-Bindung auch wichtig sein, welcher Chrom(III)-Komplex mit der DNA wechselwirkt: Ob er erst durch intrazelluläre Reduktion des Chromats entstanden oder als dreiwertiger von der Zelle aufgenommen worden ist. Das könnte bei der genotoxischen Wirkung eine große Rolle spielen. Andererseits ist auch möglich, daß das Ausmaß der DNA-Schäden bei Inkubation der V79-Zellen mit dreiwertigen Chrom-Komplexen zu gering ist, um in der Alkalischen Elution erfaßt zu werden. Auch andere Tests sprechen für eine Wirkung von dreiwertigem Chrom auf das genetische Material. Bei Lymphocytenkulturen führt $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ zu einer Erhöhung von Chromosomenaberrationen, wenn es in 100 mal höheren Konzentrationen als Chromat eingesetzt wird (Stella et al., 1982) oder die Inkubation 3 Tage dauert (Friedman et al., 1987).

Wenn auch unbestritten bleibt, daß das sechswertige Chromat ein größeres genotoxisches Potential besitzt, kann man aufgrund dieser Ergebnisse das dreiwertige Chrom nicht länger als biologisch inaktiv und die Chromatreduktion in biologischen Systemen als Detoxifikation betrachten, aus der sich ein Schwellenwert für das krebserzeugende Chromat ableiten ließe.

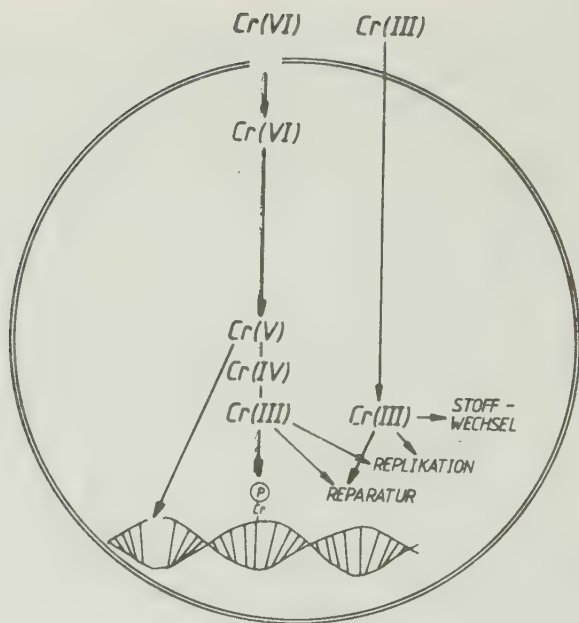


Abb. 25: Erweitertes "Aufnahme-Reduktionsmodell" für dreiwertige und sechswertige Chromverbindungen.

In der Abbildung 25 sind diese Ergebnisse in einem erweiterten Aufnahme-Reduktions-Modell für sechs- und dreiwertige Chromverbindungen dargestellt.

Im folgenden Abschnitt möchte ich mit Hilfe der vorgelegten Versuchsergebnisse und den Literaturdaten ein Modell für die Chromgenotoxizität entwickeln.

5.3 Mögliche Mechanismen der Chrom-Genotoxizität

Nach seiner Aufnahme wird das Chromat in der Zelle schnell reduziert. Die Bildung einer kurzlebigen fünfwertigen Zwischenstufe kann mit ESR gezeigt werden (Jennette, 1982). Die Bildung reaktiver strangbrechender Radikale während der Reduktion des Chromats ist in zellfreien Systemen untersucht worden und ist ein wahrscheinlicher Mechanismus der Chromgenotoxizität.

Für die Bildung von DNA-Proteinvernetzungen kann das Endprodukt der Chromatreduktion verantwortlich gemacht werden, denn bei isolierten Kernen zeigt nur das dreiwertige Chrom diese Effekte, nicht das sechswertige.

Die Bildung von DNA-Strangbrüchen, von DNA-Proteinvernetzungen, aber auch andere Veränderungen der DNA-Struktur wie Apurinstellen, können zu einer Induktion von Reparaturprozessen führen. In deren Verlauf können weitere Einzelstrangbrüche entstehen, die durch Vollendung der Reparaturprozesse wieder verschwinden. Die Forschung der letzten Jahre über DNA-Reparatur hat gezeigt, daß Säugetierzellen über eine große Palette von spezifischen Reparatursystemen verfügen. Dennoch ist die Rolle der Reparatur in der Metalltoxizität weitgehend ungeklärt und es bleibt zu untersuchen, inwieweit metall-induzierte Schäden wieder repariert werden und die Metallverbindungen ihrerseits Reparaturprozesse stören können.

Die durch Chromat induzierten DNA-Proteinvernetzungen sind persistenter als die DNA-Strangbrüche. Sugiyama und Mitarbeiter (1986) diskutieren dafür zwei mögliche Ursachen: Die Anzahl der Vernetzungen übersteigt die Kapazität des Reparatursystems oder Chrom hemmt gleichzeitig die Reparatur der eigenen Schäden. Für die letztere Erklärung sprechen zwei Untersuchungen. Lymphocyten chromatbelasteter Arbeiter haben eine geringere Kapazität zur Reparatur von UV-Schäden als normale Lymphocyten (Rudnykh, 1985) und die comutagene Wirkung von Chromat mit UV-Strahlen deutet ebenfalls auf eine Reparaturhemmung hin (Hartwig, 1987).

Sen und Costa (1986) haben an synchronisierten Zellen festgestellt, daß Nickel- und Chromverbindungen replizierende DNA schädigen, was zu einer Weitergabe von Schäden an die Tochtergeneration führt, da zuwenig Zeit für die Reparatur zur Verfügung steht. Chrom schädigt bevorzugt in der frühen S-Phase, in der das genetisch aktive Euchromatin repliziert wird, Nickel dagegen eher in der späten S-Phase während der Replikation des Heterochromatins. Damit kann erklärt werden, daß Chromat in Bakterien- und Säugetierzellen stark mutagen ist, Nickelionen demgegenüber nur schwach, obwohl sie ebenfalls an das Chromatin binden und zu DNA-Schäden führen.

Umgekehrt ist nicht jeder mutagene Effekt auf direkt Schädigung der DNA zurückzuführen. Der mutagene Effekt von dreiwertigen Chromkomplexen in V79-Zellen kann auch durch andere Mechanismen entstehen. Aus in vitro Untersuchungen ist z.B. bekannt, daß dreiwertiges und auch sechswertiges Chrom die Genauigkeit der DNA-Synthese herabsetzt (Tkeshelashvili et al., 1980). Zum anderen könnte auch dreiwertiges Chrom zu Störungen der DNA-Reparatur führen. Eine mögliche comutagene Wirkung, wie sie für Chromat beschrieben wurde, ist bislang noch nicht untersucht worden. Darüberhinaus muß man davon ausgehen, daß die oxidative Wirkung des Chromats auf Bestandteile der Zellen und die komplexierende Wirkung des dreiwertigen Chroms zu vielfältigen Störungen der zellulären Stoffwechselprozesse führen kann. Schädigungen zellulärer Membranen, Wechselwirkung mit RNA- und Proteinbiosynthese, Freisetzung lysosomaler Enzyme sollen hier nur als Beispiele genannt werden, die noch weiterer Untersuchung bedürfen, aber durchaus zur cytotoxischen, mutagenen und carcinogenen Wirkung der Chromverbindungen beitragen können. Insbesondere Veränderungen im Transcriptionsmuster beispielsweise an Oncogenen könnten zur Deregulation der Zellteilung und Zelltransformation führen.

Das Aufnahme-Reduktions-Modell basiert auf dem Befund, daß sechswertiges Chrom als Anion carriervermittelt von Zellen aufgenommen und akkumuliert wird. Ausgangspunkt der Arbeit war die Frage, ob das mutagene und carcinogene Chromat selbst das letztendlich genotoxisch wirksame Agens ist, oder ob die schädigenden Verbindungen erst im Verlauf biochemischer Reaktionen in der Zelle entstehen. Unter Verdacht standen vor allem Verbindungen des dreiwertigen Chrms, die als Endprodukte der Chromatreduktion in der Zelle auftreten.

Mit vergleichenden Untersuchungen der Wirkung von Chromat und verschiedenen Chrom(III)-Komplexen an isolierter DNA, isolierten Zellkernen und Säugetierzellen sollten mögliche Mechanismen der Chromwirkung identifiziert werden.

Es konnte bei superhelikaler DNA gezeigt werden, daß weder sechs- noch dreiwertige Chromverbindungen bei isolierter DNA Einzelstrangbrüche induzieren. Doch bei Inkubation isolierter Thymus-Zellkerne bindet dreiwertiges Chrom und nicht sechswertiges zeit- und konzentrationsabhängig an die Zellkerne. Die Untersuchung der DNA der mit dreiwertigen Chromverbindungen inkubierten Kerne in der Alkalischen Elution machte Schäden der DNA sichtbar. Sowohl $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ als auch $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$ induzierten Einzelstrangbrüche und DNA-Protein-Vernetzungen. Die Einzelstrangbrüche konnten auch mit Hilfe des Nick-Translations-Tests nachgewiesen werden. Dabei ist eine fünfwertige Chromverbindung effektiver als die getestete dreiwertige Verbindung.

Aus Aufnahmestudien mit V79-Zellen, einer permanenten Hamsterfibroblasten-Zelllinie, wurde deutlich, daß es eine Impermeabilität für dreiwertige Chromverbindungen nicht gibt. Die untersuchten Chrom(III)-Komplexe $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ und $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$ werden auch von V79-Zellen konzentrations- und zeitabhängig aufgenommen. Dabei ist die Aufnahme von $[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$ und $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$ schneller als die der

beiden anderen Chrom(III)-Komplexe, doch im Vergleich zu Chromat ist die Aufnahme aller untersuchten dreiwertigen Komplexe deutlich langsamer.

Etwa 50% des nach 24-stündiger Inkubation mit $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ und 20% des nach Inkubation mit den anderen dreiwertigen Chromkomplexen aufgenommenen Chroms ist nach Ende der Inkubationszeit am Zellkern nachweisbar. Daraus wird geschlossen, daß die dreiwertigen Komplexe nicht nur an die Membran binden, sondern in die Zellen aufgenommen werden und intrazellulär verteilt werden.

Die DNA der inkubierten Zellen wurde mit Alkalischer Elution untersucht. Die Chrombindung an den Zellkern allein reicht offensichtlich nicht aus, um DNA-Schäden zu induzieren, wie sie bei isolierten Thymuskernen durch Inkubation mit Chrom(III)-komplexen und bei V79-Zellen mit Chromat meßbar sind.

Dreiwertige Chromverbindungen stören aber auch bei intakten Säugetierzellen den Stoffwechsel, wie die weiteren Untersuchungen zur cytotoxischen und mutagenen Wirkung zeigen. Die Chrom-Komplexe mit den lipophilen Liganden Bipyridin und o-Phenanthrolin stellten sich als stark cytotoxisch heraus. Bereits in mikromolaren Konzentrationen bilden nur 50% der Zellen Kolonien, während die Komplexe $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}_2]^+$ und $[\text{Cr}(\text{Gly})_3]^0$ bei Konzentrationen bis zu 2 mM das Zellwachstum nicht beeinträchtigen.

$[\text{Cr}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]^+$ und $[\text{Cr}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]^+$ erhöhen die Mutationsrate der V79-Zellen um das 23- bzw. 13-fache. Auch der in vielen vorangegangenen Untersuchungen eingesetzte Chromtrichlorid-Komplex, der im Mutationstest mit Bakterien und Hefen widersprüchliche Ergebnisse lieferte, erhöht bei V79-Zellen reproduzierbar die Mutationsrate auf das 4-fache. Nicht mutagen ist dagegen der Chrom-Glycin-Komplex. In der Diskussion wird hervorgehoben, daß nicht einer einzigen Chromverbindung die genotoxischen Wirkungen in der Zelle zugeschrieben werden können, sondern vielmehr verschiedene Mechanismen nebeneinander denkbar sind. Es ist anzunehmen, daß sechswertiges Chrom die DNA nicht direkt schädigt. Dagegen scheinen die dreiwertigen Chromverbin-

dungen, die nach der Chromataufnahme in den Zellen entstehen, die DNA-Protein-Vernetzungen zu induzieren. Es ist wahrscheinlich, daß die Einzelstrangbrüche weder von drein- noch von sechswertigem Chrom hervorgerufen werden, sondern von reaktiven Zwischen-Produkten der Chromatreduktion. Darüberhinaus können Einzelstrangbrüche während der Reparatur von chromatinduzierten DNA-Schäden auftreten.

Da auch verschiedene dreiwertige Chromverbindungen mutagene Effekte bei den V79-Zellen gezeigt haben, ohne nachweisbare DNA-Schäden hervorzurufen, müssen weitere Wechselwirkungen, wie die mit enzymatischen Prozessen, z.B. Störung der DNA-Synthese, angenommen werden.

Die Annahme, dreiwertiges Chrom sei toxikologisch unbedenklich und die Chromatreduktion generell eine Detoxifikation, kann nicht weiter aufrecht erhalten werden.

7 Literaturverzeichnis

- Balbi, C., Vecchio, D., Russo, P., Parodi, S. und Santi, L. (1981) Effecti specifici di ioni Cr sul DNA: confronto delle interazioni fra Cr (III) e DNA purificato con le parallele interazioni che avvengono nella cellula vivente. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 57, 1143-1148
- Bartnitzke, S. (1983) Wachstum und zytogenetische Charakterisierung heteroploider Tumorzellen in vitro. Dissertation Universität Bremen
- Beyersmann, D., Köster, A., Buttner, B. und Flessel, P. (1984) Model reactions of chromium compounds with mammalian and bacterial cells. Toxicol. Environ. Chem., 8, 279-286
- Bianchi, V., Celotti, G., Majone, F., Marin, G., Montaldi, A., Spoinza, G., Tamino, G., Venier, P., Zantedeschi, A. und Levis, A.G. (1983) Genetic effects of chromium compounds. Mut. Res. 117, 279-300
- Bianchi, V., Zantedeschi, A., Montaldi, A. und Majone, F. (1984) Trivalent chromium is neither cytotoxic nor mutagenic in permeabilized hamster fibroblasts. Toxicology Letters 23, 51-59
- Bianchi, V. und Levis, A.G. (1987) Recent advances in chromium genotoxicity. Toxicol. Environ.Chem. 15, 1-24
- Blakely, W., Ward, J.F. und Joner, E.I (1982) A quantitative assay of DNA strand breaks and their repair in mammalian cells. Anal. Biochem. 124, 125 -133
- Bradley, M.O. und Erickson, L.C. (1981) Comparison of the effects of hydrogen peroxide and x-ray irradiation on toxicity, mutation and DNA damage/repair in mammalian cells (V79). BBA 654, 135-141
- Bradley, M. O., Taylor, V. I., Armstrong, M. J. und Galloway, S. M. (1987) Relationships among cytotoxicity lysosomal breakdown, chromosome aberrations, and DNA double-strand breaks. Mut. Res. 189, 69-79
- Buchmann A., Kunz, W., Schael, S., Scholz, W. und Schwarz, W. (1987) Krebs und Umwelt in: Labor 2000
- Cantoni, D. und Costa, M. (1984) Analysis of the induction of alkali sensitive sites in the DNA by chromate and other agents that induce single strand breaks. Carcinogenesis, 5, 1207-1209

- Castellot, J.J., Miller, M.R. und Pardee, A.B. (1978) Animal cells reversibly permeable to small molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 351-355
- Cupo, D. Y. und Wetterhahn, K. E. (1984) Repair of chromate-induced DNA damage in chick embryo hepatocytes. Carcinogenesis, 5, 1705-1708
- Cupo, D.Y. und Wetterhahn, K. E. (1985) Binding of chromium to chromatin and DNA from liver and kidney of rats with sodium dichromate and chromium III chloride in vivo. Cancer Res., 45, 1146-1151
- DeFlora, S., Zanacchi, P., Camoirano, A., Benicelli, C. und Baddali, G.S. (1984) Genotoxic activity and potency of 135 compounds in the ames reversion test an in a bacterial DNA repair test. Mut. Res., 133, 161-198
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (Hrsg.) (1987) Maximale Arbeitsplatzkonzentration und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Dunaway-Mariano, D. und Cleland, W.W. (1980) Investigations of substrate and reaction mechanism of several kinases using CrIII-ATP and CrIII-ADP. Biochemistry, 19, 1506-1515
- Edel, J. und Sabbioni, E. (1985) Pathways of CrIII and CrVI in the rat after intratracheal administration. Human Toxicol., 4, 409-416
- Elias, Z., Schneider, O., Aubry, F., Danierre, M.C. und Poirot, O. (1983) Sister chromatid exchanges in CH V79 cells treated with CrIII compounds chromic chloride and chromic oxide. Carcinogenesis, 4, 605-611
- Fornace jr., A. Z., Serres, D. S., Lechner, J. F. und Harris, C.C. (1981) DNA-protein crosslinking by chromium salts (chromates/CrIII). Chem.-Biol. Interactions, 36, 345-54
- Friedman, J., Shabtai, F., Levy, L.S. und Djaldetti, M. (1987) Chromium chloride induces chromosomal aberrations in human lymphocytes via indirect action. Mut. Res., 191, 207-210
- Galli, A., Boccardo, P., DelCarratore, R., Cundari, E. und Bronzetti, G. (1985) Conditions that influence the genetic activity of $K_2Cr_2O_7$ and $CrCl_3$ in saccharomyces cerevisiae. Mut. Res., 144, 165-169

- Gentile, J.M., Hyde, K. und Schubert, J. (1981) Chromium genotoxicity as influenced by complexation and rate effects. *Toxicol. Lett.*, 7, 439-448
- Hamilton, J.W. und Wetterhahn, K.E. (1986) Chromium VI induced DNA damage in chick embryo liver and blood cells in vivo. *Carcinogenesis*, 7, 2085-2088
- Hartwig, A. (1987) Mutagenität und Comutagenität von Nickel- und Chromverbindungen. Dissertation Universität Bremen
- Hecht, R. Und Thielmann, H.W. (1978) Purification and characterization of an endonuclease from *micrococcus luteus* that acts on depurinated and carcinogen modified DNA. *Eur. J. Biochem.* 89, 607-613
- Hopkins, L.L. (1965) Distribution in the rat of physiological amounts of injected Cr (III) with time. *Amer.J.Physiol.*, 209, 731-735
- Hsia, M.T.S., Kreamer, B.L. und Dolara, P. (1983) A rapide and simple method to quantitate chemically induced unscheduled DNA synthesis in freshly isolated rat hepatocytes facilitated by DNA retention of membrane filters. *Mut. Res.*, 122, 177-185
- Hsie, A.W., Couch, D.B., O'Neill, J.P., San Sebastian, J.R., Brimer, P.A., Machanoff, R., Riddle, J.C., Li, A.P., Fuscoe, J.C., Forbes, N. und Hsie, M.H. (1979) Utilization of a quantitative mammalian cell mutation system, CHO/HGPRT, in experimental mutagenesis and genetic toxicology. in: Butterworth, B.E. (Ed.): *Strategies for short-term testing for mutagens/carcinogens*. CRC Press Inc. Palm Beach, Florida
- Jennette, K.W. (1982) Microsomal reduction of the carcinogen chromate produces Chromium(V). *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 874-75
- Johansson, A., Robertson, B., Curstedt, T. und Camner, P. (1987) Alveolar macrophage abnormalities in rabbits exposed to low concentrations of trivalent chromium. *Environm. Res.*, 44, 279-293
- Kawanishi, S., Inoue, S. und Sano, S. (1986) Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate(VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 261, 5952-5958
- Kleinig, H. und Sitte, P. (1986) *Zellbiologie*. G. Fischer Verlag. Stuttgart, New York, 2. Auflage
- Kohn, K.W., Erickson, L.C., Ewig, R.A.G. und Friedman, C.A. (1976) Fractionation of DNA from mammalian

cells by alkaline elution. *Biochemistry*, 15, 4629-4637

- Kohn, K.W. (1979) DNA as a target in cancer chemotherapy: measurement of macromolecular DNA damage produced in mammalian cells by anticancer agents and carcinogens. *Methods in Cancer Research*, 16, DeVita jr., V.T. und Bush, H. (Hrsg.) Academic Press, New York, 291-345
- Kohn, K.W., Ewig, R.A.G., Erickson, L.C. und Zwelling, L.A. (1981) Measurement of strand breaks and cross-links by alkaline elution. in: Friedberg, E. und Hanawalt, P. (Hrsg.) *DNA repair, a laboratory manual of research procedures*, Dekker, New York, 379-401
- Korallus, U. (1986) Chromium compounds: occupational health, toxicological and biological monitoring aspects. *Toxicol. Environ. Chem.*, 12, 47-59
- Kortenkamp, A., Beyersmann, D. und O'Brien, P. (1987) Uptake of chromium(III) complexes by erythrocytes. *Toxicol. Environ. Chem.*, 14, 23-32
- Kortenkamp, A., Ozolins, Z., Beyersmann, D. und O'Brien, P. (1988) Generation of PM2 DNA breaks in the course of reduction of chromium(VI) by glutathione. Eingereicht zur Veröffentlichung.
- Langard, Sverre (1979) The time-related subcellular distribution of chromium in the rat liver cell after intravenous administration of $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$. *Biol. Trace Element Research*, 1, 45-54
- Langerwerf, J.S.A., Bakkeren, H.A. und Johgen W.M.T. (1985) A comparison of the mutagenicity of soluble trivalent chromium compounds with that of potassium chromate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9, 92-100
- Lee, S.D. (1987) Health assessment of chromium, in: *Toxicology of metals: clinical and experimental research*, Brown, S.S. und Kodama, Y. (Hrsg.) Ellis Horwood Limited New York
- Lehmann, P. (1982) *Krebs am Arbeitsplatz. Schriftenreihe Gefährliche Arbeitsstoffe Nr. 7*, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Unfallforschung, Dortmund
- Levis, A.G., Bianchi, V., Tamino, G. und Pegoraro, B. (1978) Cytotoxic effects of hexavalent and trivalent chromium on mammalian cells in vitro. *Br. J. Cancer*, 37, 386-396
- Lewalter, J., Korallus, U., Harzdorf, C. und Weidemann, H. (1985) Chromium bond detection in isolated ery-

- throcytes: a new principle of biological monitoring of exposure to hexavalent chromium. *Int. Arch. Occup. Environm. Health*, 55, 305-318
- Montesano, R., Parkin, D.M. und Tomatis, L. (1987) Environmental causes of cancer in man. in: *Biology of carcinogenesis*. Waring, M.J. und Ponder, B.A. (eds.) MTP Press Unlimited, Lancaster
- National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) (1975) Biological effects of exposure, in: *Criteria for a recommended standard: occupational exposure to chromium(VI)*. US Department of Health Education and Welfare, Washington, 23-121
- Newbold, R.F., Amos, J. und Connell, J.R. (1979) The cytogenetic, mutagenic and clastogenic effects of chromium-containing compounds of mammalian cells in culture. *Mut. Res.* 67, 55-63
- Nishio, A. und Uyeli, E.M. (1985) Inhibition of DNA synthesis by chromium compounds. *J. Toxicol. Environ. Health* 15, 237-244
- Österberg, R., Persson, D und Bjursell, D.P. (1984) The condensation of DNA by chromium(III) ions. *J. of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2, 285-290
- Paschin, Y.V., Kozachenko, V.I. und Sal'nikova, L.E. (1983) Differential mutagenic response at the HGPRT locus in V79 and CHO chinese hamster cells after treatment with chromate. *Mut. Res.*, 122, 361-365
- Richter-Landsberg, C., Greene, L.A. und Shelanski, M.L. (1985) Cell surface thy-1-cross-reactive glycoprotein in cultured PC12 cells: modulation by nerve growth factor and association with the cytoskeleton. *The Journal of Neuroscience*, 5, 468-476
- Rudnykh, A.A. (1985) In vivo and in vitro DNA-repair synthesis under the influence of chromium compounds in human lymphocytes. *Mut. Res.*, 147, 316-17
- Schaaper, R.M., Koplitz, R.M., Tkeshelashvili, L.K. und Loeb, L.A. (1987) Metal-induced lethality and mutagenesis: possible role of apurinic intermediates. *Mut. Res.*, 177, 179-188
- Seawell, P.C. und Ganesan, A.K. (1981) Measurement of strand breaks in supercoiled DNA by gel electrophoresis. in: *Friedberg, E. und Hanawalt, P. (eds.) DNA repair, a laboratory manual of research procedures*. Dekker, New York 425-430

- Sen, P. und Costa, M. (1986) Incidence and localization of sister chromatid exchanges induced by nickel and chromium compounds. *Carcinogenesis*, 7, 1527-1533
- Sirover, M.A. und Loeb, L.A. (1976) Infidelity of DNA synthesis in vitro: screening for potential metal mutagens or carcinogens. *Science*, 194, 1434-1436
- Snyder, R.D. und Matheson, D.W. (1985) Nick Translation - a sensitive assay for monitoring DNA damage and repair in cultured human fibroblasts. *Environmental Mutagenesis* 7, 267-279
- Steinhoff, D., Gad, S.C., Hatfield, G.K. und Mohr, U. (1986) Carcinogenicity study with sodium dichromate in rats. *Exp. Pathol.*, 30, 129-141
- Stella, M., Montaldi, A., Rossi, R., Rossi, G. und Levis, A.G. (1982) Clastogenic effects of chromium on human lymphocytes in vitro and in vivo. *Mut. Res.*, 101, 151-164
- Sugiyama, M., Patierno, S.R., Cantoni, O. und Costa, M. (1986) Characterization of DNA lesions induced by CaCrO_4 in synchronous and asynchronous cultured mammalian cells. *Mol. Pharm.*, 29, 606-613
- Tamino, G., Peretta, L. und Levis, A.G. (1981) Effects of trivalent and hexavalent chromium on the physico-chemical properties of mammalian cell nucleic acids and synthetic polynucleotides. *Chem.-Biol. Interactions*, 37, 309-319
- Tandon, S.K., Saxena, D.K., Gaur, J.S. und Chandra, S.V. (1978) Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium. *Environmental Research*, 15, 90-99
- Tindall, K.R. und Hsie, A.W. (1980) Mutagenic and cytotoxic effects of hexavalent and trivalent chromium in CHO/HGPRT system. *Environmental Mutagenesis*, 2, 293-294
- Tkeshelashvili, L.K., Shearman, C.W., Zakour, R.A., Kopplitz, R.M. und Loeb, L.A. (1980) Effects of arsenic, selenium and chromium on the fidelity of DNA. *Cancer Res.*, 40, 2455-2460
- Tsapakos, M.J., Hampton, T.H. und K.E. Wetterhahn (1983) Chromium(VI) induced DNA lesions and chromium distribution in rat kidney, liver and lung. *Cancer Research*, 43, 5662-5667
- Venitt, S. und Parry, J.M. (1984) *Mutagenicity Testing - A practical approach*. IRL Press, Oxford, Washington D.C.

- Waring, M.J. und Ponder, B.A. (Hrsg.) (1987) The biology of carcinogenesis. MTP Press Unlimited, Lancaster, U.K.
- Warren, G.R., Schultz, P., Bancroft, D., Bennett, K., Abbott, E.H. und Rogers, S. (1981a) Mutagenicity of a series of hexacoordinate chromium(III) compounds. Mut. Res., 90, 111-118
- Warren, G.R., Abbott, E.H., Benett, K., Schultz, P. und Rogers, S. (1981b) Mutagenicity of a series of hexacoordinate rhodium(III) compounds. Mut. Res. 88, 165-173
- Wedrychowski, A., Ward, W.S., Schmidt, W.N. und Hnilica, L.S. (1985) Chromium-induced cross-linking of nuclear proteins and DNA. The Journal of Biological Chemistry, 260, 7150-7155
- Whiting, R.F., Stich, H.F. und Koropatnick, D.J. (1979) DNA damage and DNA repair in cultured human cells exposed to chromate. Chem.-Biol. Interactions, 26, 267-280

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Prof. Dr. Detmar Beyersmann und der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und die gemeinsamen Zeiten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Schwarz, DKFZ Heidelberg, für die Unterstützung beim Aufbau der Alkalischen Elution.

Gudrun Oetken möchte ich stellvertretend für die Arbeitsgruppe Irene Witte in Oldenburg danken für die Kooperation und die Unterstützung bei den Untersuchungen an superhelikaler DNA.

Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen des Zentralkrankenhauses St.-Jürgen-Str. für die Hilfe bei der Bestrahlung der Zellen.

Christoph Köster und Michael Ries danke ich für die Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit.

Der Hans-Böckler-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung der Promotion und die Ermöglichung der Teilnahme an verschiedenen Fachkongressen.

Besonders möchte ich meinen Eltern danken, für die Unterstützung nicht nur während des Studiums.

Annette Köster, Bremen

Lebenslauf

1.3.1958	geboren in Gessel, Kreis Grafschaft Hoya
1964 - 1968	Grundschule an der Butjadinger Straße, Bremen
1968 - 1976	Gymnasium Huckelriede, Bremen Abschluß mit dem Abitur
1976 - 1983	Studium der Biologie an der Universität Bremen
1983	Abschluß des Studiums mit dem Diplom, Thema der Diplomarbeit: "Untersuchungen zur Reduktion von Chromat in Erythrocyten des Menschen"
1983	Zulassung als Doktorandin an der Universität Bremen

Veröffentlichungen

- D. Beyersmann, A. Köster, B. Buttner and P. Flessel: Model Reactions of Chromium Compounds with Mammalian and Bacterial Cells in: Carcinogenic and Mutagenic Metal Compounds. E. Merian (Ed.) Current Topics in Environmental and Toxicological Chemistry Vol.8, New York, 1985 pp. 303-310
- A. Köster and D. Beyersmann: Chromium Binding by Calf Thymus Nuclei and Effects on Chromatin; Toxicological and Environmental Chemistry (1985) 10, 307-313
- D. Beyersmann and A. Köster: On the Role of Trivalent Chromium in Chromium Genotoxicity; Toxicological and Environmental Chemistry (1987) 14, 11-22

